



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



Universidad de Granada  
Departamento de Parasitología  
Instituto de Biotecnología

**Interactoma de las exovesículas de *Trypanosoma cruzi*  
con las células del hospedador; Implicaciones en la  
patología de la Enfermedad de Chagas.**

**Tesis doctoral**

Programa de doctorado en Biología Fundamental y de  
Sistemas

**Doctorando**

Alberto Cornet Gómez

**Director**

Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

**Fecha**

Febrero, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Alberto Cornet Gómez  
ISBN: 978-84-1195-303-0  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92347>



La tesis doctoral titulada “Interactoma de las exovesículas de *Trypanosoma cruzi* con las células del hospedador; Implicaciones en la patología de la Enfermedad de Chagas” fue realizada por el doctorando Alberto Cornet Gómez, bajo la supervisión del Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, en el grupo de investigación CTS183, perteneciente al departamento de Parasitología y al Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada.

El doctorando y el director de tesis garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de tesis y, hasta donde nuestro conocimiento alcanza en la realización del trabajo se han respetado los derechos de otros autores al ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada, a 15/02/2024

**Antonio Osuna Carrillo de Albornoz**

Director de tesis doctoral

**Alberto Cornet Gómez**

Doctorando

Esta tesis doctoral se presenta en modalidad compendio de publicaciones. Consta de una introducción, metodología y discusión común, mientras que los capítulos 1, 2 y 3 han sido previamente publicados en revistas científicas de alto impacto:

- Retana Moreira L, Prescilla-Ledezma A, Cornet-Gomez A, Linares F, Jódar-Reyes AB, Fernandez J, Ibarrola Vannucci AK, De Pablos LM, Osuna A. Biophysical and Biochemical Comparison of Extracellular Vesicles Produced by Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. Int J Mol Sci. 2021 May 13;22(10):5183. doi: 10.3390/ijms22105183. PMID: 34068436; PMCID: PMC8153575.
- Cornet-Gomez A, Retana Moreira L, Kronenberger T, Osuna A. Extracellular vesicles of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce changes in ubiquitin-related processes, cell-signaling pathways and apoptosis. Sci Rep. 2023 May 10;13(1):7618. doi: 10.1038/s41598-023-34820-6. Erratum in: Sci Rep. 2023 Jun 6;13(1):9187. PMID: 37165081; PMCID: PMC10171165.
- Cornet-Gomez A, Retana Moreira L, Gomez-Samblás M, Osuna A. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* and immune complexes they form with sialylated and non-sialylated IgGs increase small peritoneal macrophage subpopulation and elicit different cytokines profiles. Front Immunol. 2023 Aug 2;14:1215913. doi: 10.3389/fimmu.2023.1215913. PMID: 37600828; PMCID: PMC10434529.

Además, se encuentran en proceso de publicación:

- Cornet-Gomez A, Osuna A., De Pablos LM. What are extracellular vesicles? Implications in the pathophysiology of

diseases and infections and current biomedical applications. Tirado M, Vicario de la Torre M, Jódar-Reyes AB. *Soft Nanoparticles for Biomedical Applications*. The Royal Society of Chemistry

- Cornet-Gomez A, Martin-Oliva D, O'Valle F, Garrido J, Rodríguez Serrano F, Osuna A. Intravenous administration of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles and immune complexes induces cardiac alterations similar to Chagas disease.
- Cornet-Gomez A, Osuna, A. Characterization of exomeres isolated from a conditioned medium of infective forms of *Trypanosoma cruzi*
- Cornet-Gomez A, Prescilla-Ledesma A, Retana Moreira L, Garcia-Alonso M, Osuna A. Immune response induced in mice upon the inoculation of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles and immune complexes

Por último, parte de os resultados de esta tesis doctoral han sido presentados en:

- 9th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, April 21-23, 2021. Oral presentation entitled: "Dual role of *Trypanosoma cruzi* exovesicles in cell apoptosis: evaluation of the molecular mechanism involving the effect in cell viability"
- XXII congreso de la Sociedad Española de Parasitología celebrado en Madrid del 5 al 8 de julio de 2022. Póster titulado: Reconocimiento antigénico de la Prohibitina 2 recombinante de

*Trypanosoma cruzi* por el suero de pacientes con la enfermedad de Chagas.

- XXII congreso de la Sociedad Española de Parasitología celebrado en Madrid del 5 al 8 de julio de 2022. Póster titulado: Efecto de la proteína MASP52 en la internalización de *Trypanosoma cruzi* y su replicación intracelular

## Agradecimientos

Quisiera dedicaros unas frases que valieran lo que vale vuestra luz, aunque al igual que el universo no cabe en una imagen, tampoco en unas frases cabe mi gratitud; a todos aquellos que me quieren y que quiero.

A mi madre, porque en ocasiones el amor es un regalo, gracias por regalármelo. Gracias mamá por los miles de kilómetros a tu espalda, por comer a las tantas y además corriendo para llevarnos a todas las actividades, por tu sacrificio por nosotros. Gracias por transmitirme tu concepto de familia, gracias por enseñarme el cariño más puro que existe. Gracias por cuidarnos siempre. Que afortunados los que estamos a tu alrededor mamá. A mi padre, por regalarme también tantísimo amor, por no perderte ningún partido de balonmano, fuese donde fuese, por tu apoyo incondicional. Por ese sentido del humor tan tuyo, que ya también es mío, por todas esas tonterías que nos hacen reír a todos. Gracias porque siempre he tenido en ti un ejemplo del investigador que quiero ser, por transmitir tu pasión por la ciencia y por la universidad. Por siempre ayudarme en todo lo que estaba en tu mano, que suerte la mía. A mi hermano, por cuidarme tanto, por ayudarme tanto, por ejercer de hermano mayor incluso con un océano de por medio. Que alegría que me haya tocado un hermano del que tengo tantísimo que aprender, que suerte que siempre estés tan dispuesto a compartir todo lo que sabes. Gracias Nano, por ser la zanahoria que este burro ha seguido hasta llegar hoy hasta aquí. A Sara, gracias por tu sonrisa continua, por siempre tener algo agradable que decir, por tu fuerza. Gracias también por complementar a mi hermano a la perfección, que tranquilidad saber que, aunque estéis lejos y con mucho frío, estáis juntos así que todo estará bien.

A mis abuelas, Carmen y Pilar, gracias por dejarme grabados a fuego tantos recuerdos preciosos, gracias también por consentirme un poquito como buen nieto pequeño. Tristemente nos dejasteis demasiado pronto,



felizmente os llevo sempre conmigo, por sempre jamás. Ojalá estuviéseris orgullosas de mí.

A mis tías, Carmen, Victoria, Tipaco y Jose Luis, a mis primas, Carmen, Ana, Daniel, Carmen, Benja, Darren y Gregor, gracias a la alegría y energía de la familia personificadas en pequeños torbellinos, Anita, Pablillo, Sofía y Mario, que ganas de achucharos. Gracias a todos por las reuniones familiares que tanta fuerza dan en momentos duros de la tesis, gracias por cocinar tan bien, porque las cosas son más fáciles después de comer bien, al menos para los Gómez.

A mi tía Pilar, por ser un ejemplo de fuerza, independencia y vitalidad. A mi primo Xavi, al primo de zumosol, por escucharme cuando lo necesité, por los consejos y por esos días por Portugal. A mi primo Borja por llenarme de pájaros la cabeza, por todas las historias de viajes, por el viaje a Marruecos y por los que quedan por venir.

Mil millones de gracias a mi familia por ser como son y hacerme a mí como soy hoy. Vosotros habéis sido los ceramistas, yo tan solo arcilla en vuestras manos.

A Paco y Encarnita, por todos esos cafés que dan energía y no por la cafeína, por quererme de una manera tan subjetiva, viendo solo lo bueno y obviando lo menos bueno.

A mis amigos de toda la vida, que no saben de bichos ni de ciencia, pero solo con mirarme saben cómo estoy.

A Pablo, por tu manera de entender la vida, por tu locura, por esa hamburguesa en las canteras, por Croacia y por sacarme de la zona de confort cuando ha hecho falta. A Gonzalo, por todos los momentos compartidos, por las dos o tres noches que hemos salido en estos años, por hacerme saber que siempre estás ahí y no solo para lo bueno. A Pelu, por aguantarme desde el primer hasta el último día de clase, porque cuando

nos vemos parece que fue ayer cuando salimos del colegio. A Carlos, porque, cuando te dejas, es maravilloso compartir tiempo contigo, por todas las inquietudes compartidas, pronto la oposición nos dejará compartir más tiempo de calidad. A David, por ser un ejemplo de constancia y de diversión cuando toca. A Montoro, por esa sensibilidad tan tuya que durante tanto tiempo ha sido tan compartida. A Andrés, por tu intensidad para vivirlo todo, porque estar contigo siempre es bien. A Akash, por tantos momentos vividos, por preocuparte tanto de los tuyos, por tu generosidad sin límite. A María Palma, por tu madurez para gestionar situaciones tan complejas, pero también por tus continuas ganas de divertirte. A Caye, Miguel, Julia, Elvira, a mis Martas, Castilla, Chansa, gracias por tantos momentos que de una u otra forma me han ayudado a llegar hasta aquí.

A mi segunda casa, gracias a Fany, Oli, Pisco, Sergio, Pedro, sabéis lo importantes que habéis sido para mí. Gracias a Bruno, Mara, Dani, Ana, Inma, Carmen, Lorenzo, Martina, Leo... a toda la gente que han hecho que esta etapa de escribir sea un poco menos cansada.

Gracias a Rocío, Javi, Alba e Ignacio, porque hicisteis de los años de carrera fueran un poquito más fáciles. Gracias también a todos los amigos del máster, que hicieron de ese un año inolvidable. Gracias a todos los profesores que se han esforzado por transmitir no solo sus conocimientos, sino su pasión por la investigación. Especial agradecimiento a las profesoras que siempre han estado dispuestas a echar una mano, Ana Belén Jódar, Chari Sepúlveda, Anabel Azuaga, Conchi Jiménez, Coral del Val, José Ángel Traverso, Natalia Navas, David Martín, Veronika Neubrand.

A Ana, porque compartimos muchísimos momentos durante muchos años, tanto buenos como algunos extremadamente duros, porque crecimos juntos, porque compartiste los primeros años de doctorado, en los que el laboratorio era casi una obsesión. A Rafa, Ana, Juan, Mari Carmen, Macarena... a todos, os recuerdo con cariño.

Gracias a ti, Antonio. Eres la persona que más ha influido en mi vida académica, si no hubieses aparecido en mi vida probablemente ni hubiese sido biotecnólogo. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio incluso siendo un niño, literalmente. Gracias por todos los conocimientos transmitidos, pero sobre todo gracias por inculcar en mi la pasión por esta profesión. Gracias porque detrás de cada vez que me has regañado, que no han sido pocas veces, se podía ver que lo hacías porque creías que era lo mejor para mí. Me considero un afortunado de que hayas sido mi director de tesis, ojalá tu dentro de unos años estés orgulloso de haberme dirigido. Siempre agradecido a ti, Antonio.

A Mercedes, lo más parecido a una hermana mayor en la ciencia, tu también me has visto crecer y madurar, no mucho, pero algo. Te agradezco tu disponibilidad siempre para echar una mano, agradezco como nuestra relación ha ido madurando desde que me enseñaste lo que es trabajar en un laboratorio de biología siendo yo un adolescente, pasando por ser mi profesora de prácticas hasta llegar a una amistad tan bonita, te aprecio mucho y te debo mucho.

A Lis, a ti te tengo tantas cosas que agradecer... mi agradecimiento es tan objetivo que te puedo decir que, sin ti, mi tesis nunca podría haber sido por agrupación de publicaciones. Pero mi agradecimiento hacia ti va mucho más allá de lo objetivo, me has enseñado tanto que no se puede enumerar, pero lo llevo muy dentro de mí. Eres un ejemplo a seguir para mí, soy un afortunado de poder admirar profesionalmente a una amiga que quiero tanto. Lo celebraremos en Tiquicia, hermanita.

A Alberto, porque eres una prolongación de mí, o yo de ti, ya ni lo sé. Mi compañero de laboratorio, de tenis, "de piso", mi socio cervecero... tantas cosas que ni se pueden enumerar. Mil gracias, Alberto por los cientos de cafés y cervezas sanadoras, cuando más hartos hemos estado de los experimentos o de las situaciones complicadas que nos han tocado. Gracias

por tanta ayuda en estos años, también he aprendido mucho de ti, pero sobre todo gracias por estar siempre. Ojalá sientas que una partecita de esta tesis es tuya, porque yo lo siento así. Cuantas canciones hemos cantado, a cuantos conciertos hemos ido, cuantas bromas nos hemos seguido... que importante has sido en esta etapa, espero que lo sigamos siendo el uno para el otro por mucho tiempo más.

A Juan, nunca tres meses fueron tan largos, ni tan bonitos. Que poquito tiempo te hizo falta para ganarte un sitio en mi corazón para siempre, gracias Juan por tantos consejos, por tanta vida compartida juntos, por abrirme las puertas de tu casa, da igual lo poco que nos veamos y lo difícil que es a veces coincidir para hablar, no es tan necesario cuando sabes que la amistad es tan poderosa. Nos debemos esta celebración.

A Marisel, aunque tampoco sabes ni de bichos ni de ciencia, no podía alejarte de Juan y de Alberto, mil gracias, Marisel por tantos cafés, vinos, conciertos y risas compartidos, y gracias de antemano por todos los que están por venir, pasar tiempo contigo siempre es un regalo.

A Susana, por toda la orientación académica, por apagar algún que otro fuego que mis despistes han generado, por estar siempre disponible. También por las reuniones en tu casa, de esas que unen al laboratorio, que por cierto, hace mucho que no hacemos, aquí lo dejo... Gracias Susana.

A Luismi, por tener una pasión contagiosa por la investigación, por todas las dudas que me has resuelto durante esta etapa, que no han sido pocas. Por las rutas que siempre propones, por todas las actividades que nos hacen ser un laboratorio más unido.

A Alexa, por hacerme más fuerte, por demostrarme que en la vida siempre te puedes encontrar personas que te no te tratarán bien solo por ser quien eres.

A Romina y Ana Karina, por tanto mate, terere y conversaciones compartidas, porque siempre fue la mejor manera de empezar las mañanas, incluso los días que no salían los experimentos.

A María Álvarez, por el añito que pasaste con nosotros, teniendo que soportar las bromitas de Alberto y mías, siempre con una sonrisa, nos debemos unas inmersiones.

A Gloria, por siempre tener un tiempo para explicar lo que sabes a los demás, porque eres una de las personas más profesionales que conozco, por transmitirme un poquito de tu perfeccionismo, no tanto como querrías, pero un poco sí.

A Celia, porque aunque fue solo un año, fue... buah. Por enseñarme a ser libre y no dejar de sonreír, por enseñarme que es mejor nunca dejar de descubrir que la vida es un tesoro.

A Indira, por todas tus visitas a este laboratorio, que aunque han sido muchas siempre nos saben a poco. Por escucharme en esa etapa de transición, por tu cariño.

A Jennifer, por todos los consejos que me has dado en estos años, que no han sido pocos, por aguantar todas las bromas y chistes malos, que han sido muchísimas. Pero sobre todo gracias por tu comprensión en esta última etapa, sabes que para mí fue muy importante

A Jessiquinha, que bonito que vinieras, pero fue más bonito que volvieras, ojalá que para quedarte, que ya tienes una hija granadina. Te agradezco tu cariño constante, siempre con una sonrisa y un abrazo que ofrecer, aunque en ocasiones la situación no sea fácil, tengo la seguridad de que todo te irá bien, porque lo mereces.

A Kata y Lia, porque fue una etapa muy bonita y divertida del lab, ojalá nos volvámos a encontrar.

A Lina, mi 2c, por darme uno de los consejos que más he recordado durante la escritura de esta tesis doctoral, por el tiempo compartido.

A María Buendía, porque te bastó un mes para hacerte un hueco en el laboratorio, por darme el b1 en apicultura.

A Pablo, fue una suerte poder enseñarte algo de lo poco que se, fue una suerte trabajar juntos en unos experimentos tan bonitos para mí. Gracias por después de eso, seguir compartiendo buenos ratos juntos, siempre con buena música y alguna que otra infusión de cebada.

A Olguita, tu llegada fue en un momento crucial de mi vida, y de repente, te convertiste en un apoyo fundamental para mí en una etapa difícil y eso nunca se me va a olvidar, tienes una sensibilidad preciosa y una capacidad de comprensión que es un tesoro. Gracias por tantos momentos vividos, ojalá vayamos acumulando cada día más.

A Marga/Marta/Marisa, por ser sinónimo de diversión, porque estar contigo significan risas y buenos momentos. Por hacer el sacrificio de tomar Cruzcampo y librarnos al resto de esa penitencia.

A Carmen, por coger el teléfono esa mañana de enero, de dos años después de la cuenta. Porque después de esa llamada construimos una amistad pura, gracias por ser una fuente inagotable de energía, siempre transmitida. Lo sabes de sobra, pero te valoro muchísimo.

A Tamara o dátil para nuestros amigos portugueses, gracias por los consejos, los abrazos y las conversaciones ya sea en tu casa (la tertulia) o en la mía (el J&J). Gracias porque desde muy pronto hubo un entendimiento especial, que hoy en día es aun más fuerte. Vendrán tiempos mejores, pero mientras tanto, nunca dejes de ser la Tamara divertida que nos hace felices a todos.

A Pedro, gracias maquinilla por tantas risas en esta última etapa, cuando más necesarias han sido, por todos los vídeos míticos que hemos

recordado y bueno, por Melendi antiguo. No pierdas la energía que tienes ahora, mantente constante y el éxito que mereces llegará, aunque sin ánimo de lucro, ¿qué preferirías ser doctor o 6 cajas de valeriana?

Gracias también a Inés, Yadira, Sergio, Toni, Noelia, Carolina, Carmen, Carlos, a tantas personas que han pasado por este laboratorio, haciendo de él un sitio mejor.

A todas las personas que hacen del INGEBI un lugar maravilloso, no puedo dejar de acordarme de Ale, no se puede tener mejor anfitrión, con muchísimo que ofrecer en lo profesional, pero por supuesto también en lo humano y en lo cultural, no sabes lo agradecido que te estoy Ale. Sois tantos que no puedo escribiros a todos, porque injustamente dejaría algo en el tintero, pero no puedo dejar de dejar por escrito vuestros nombres: Rosario, Ceci, Arturo, Silvia, Sofía, Lady, Marco, Mica, Karen, Fati, Kari, Nachito, Flor, Gonza, Tomás, Lara, Clara, Indi, Caro, Javi, Rami, Coti, Edgar, Iván, Ceci, Santi, Cata, Nati, Mora, Caro, Jessi, Martu, Juani, Alejo, Juan, Salo, Guille, Paula, Lorena, Agus, Dani, Flor comeगतos y por supuesto también a Rubén. Gracias a todos por recibirme con los brazos abiertos, gracias por hormiga negra, por el fulbito y porque nunca había disfrutado tanto en una biblioteca. Gracias por ser un ejemplo eterno de resiliencia, y más ante las complejidades que se vienen. Gracias por hacerme sentir en casa incluso a miles de kilómetros de mi Granada, gracias por darme las fuerzas necesarias para escribir esta tesis. Aguante Argentina siempre. Gracias, os llevo conmigo.

A Agustina, mi mesera de cabecera, los meses en Argentina me regalaron reencontrarnos, un océano de distancia no significa nada, gracias por hacerme sentir en familia, te echo mucho de menos amiga, pero tengo la tranquilidad de saber que nos veremos pronto.

Gracias a Carlos y Encarna, por todo el trabajo que hace que nuestra labor sea un poquito más fácil. Gracias a Cloti, María José, Manolo, Victoriano,

Marga, a todos los que han compartido docencia conmigo, echándome una mano en los inicios, que nunca son fáciles. Gracias a Fernando Rodríguez por la colaboración y sobre todo por el trato, que ganas de que salga adelante el trabajo pendiente. Gracias a los técnicos del CIC, David, Juande, Dani, María José, Ana Fernández, Ana Santos y especialmente a Jaime Lazuen. Mil gracias a Ana Nieto, siempre es un placer trabajar contigo y aprender de ti.

A ti, Mariniya, porque llegaste cuando más te necesitaba, deslumbrándome con tu luz una tarde cualquiera. Porque le diste un vuelco a mi vida, la sacudiste y me acompañaste a deconstruir todo lo que no me gustaba de la persona que me estaba convirtiendo, gracias por acompañarme reconstruir la persona que realmente quiero ser, por devolverme la ilusión, las ganas de hacer cosas nuevas y por recuperar las ganas de aprender, por llevarte las ganas de llorar y guardarlas en un sitio donde nunca vuelvan a aparecer. Por ser la persona que más ha sufrido el estrés, el cansancio y la apatía durante las etapas más difíciles, porque sin ti hubiese sido muchísimo más difícil. Gracias por supuesto a Carmen, Francis, Javier, Ortensia y Luisa, por las papas, el mojo y sobre todo por el cariño. Marina, me siento tremendamente afortunado de tenerte en mi vida.

Quizás son unos agradecimientos demasiado largos, pero bueno, solo voy a hacer una tesis doctoral en mi vida.

Gracias por demostrarme día a día que no hace falta una fortuna para ser afortunado. Gracias a todos, yo no valdría nada sin vosotros.





## Tabla de contenido

Resumen.....	21
Summary .....	27
1. Introducción .....	3
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> : características generales y ciclo de vida.....	3
Estadios del parásito.....	4
Ciclo de vida.....	8
Epidemiología .....	13
1.2. Enfermedad de Chagas:.....	20
Sintomatología y manifestaciones clínicas .....	20
Diagnóstico .....	23
Tratamiento y control de la transmisión.....	26
1.3. Vesículas extracelulares.....	29
Clasificación de las EVs .....	31
Los cuerpos apoptóticos.....	31
Ectosomas o microvesículas .....	32
Los exosomas.....	34
• Biogénesis.....	34
• Composición de los exosomas.....	40
• Funcionalidad de los exosomas.....	46
• Potenciales aplicaciones de los exosomas .....	53
1.4. Vesículas extracelulares en enfermedades parasitarias.....	60
2. Objetivos.....	71
Objetivo general: .....	73
Objetivos específicos .....	73
3. Metodología .....	75
3.1. Cultivos celulares.....	77
Cultivo de células Vero .....	77
Cultivo de parásitos .....	78
Cultivo de epimastigotes y metaciclologénesis <i>in vitro</i> .....	78

## Tabla de contenido

Cultivo de formas tripomastigotes derivadas de cultivo celular .....	80
3.2. Obtención y purificación de EVs liberadas por formas tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> . Cuantificación de las proteínas presentes en las EVs .....	80
Cuantificación de proteínas con <i>Micro BCA™ Protein assay kit</i> .....	81
Análisis del tamaño y pureza de las EVs purificadas.....	82
<i>Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)</i> .....	83
<i>Dynamic Light Scattering (DLS)</i> .....	84
Microscopía electrónica de transmisión.....	84
Microscopía de fuerza atómica .....	85
3.3. Obtención de un inmunisero anti- <i>T. cruzi</i> .....	86
Purificación de inmunoglobulinas del suero de los animales inmunizados .....	89
Purificación con columna de proteína G .....	89
Purificación con Melon™ Gel.....	90
3.4. Western blotting.....	90
4. Capítulo 1 .....	93
Abstract .....	96
Introduction.....	98
Results .....	100
Discussion .....	115
Materials and Methods .....	122
Conclusions.....	133
5. Capítulo 2 .....	143
Abstract .....	146
Introduction.....	147
Results .....	150
Discussion .....	162
Methods .....	172
6. Capítulo 3 .....	189
Abstract .....	191
Introduction.....	193

Materials and Methods .....	200
Results .....	213
Discussion .....	230
7. Discusión.....	251
8. Conclusiones.....	285
Conclusión general .....	289
8. Conclusions.....	291
General conclusion .....	294
9. Bibliografía.....	297



# Resumen



*Trypanosoma cruzi*, es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, un protozoo flagelado de multiplicación intracelular obligada en el hospedador mamífero. En su ciclo biológico intervienen insectos triatominos hematófagos y hospedadores mamíferos. La enfermedad cursa con una fase aguda, seguida de una fase crónica en la que alrededor del 30-40% de los pacientes desarrollan sintomatología cardíaca o digestiva severa.

La obtención y separación de las vesículas extracelulares (EVs) utilizadas en esta tesis doctoral, se realizó mediante una metodología puesta a punto por nuestro grupo de investigación, la cual contiene procedimientos combinados de centrifugación, filtración y ultracentrifugación diferencial a partir de cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Pan4, perteneciente al UDT I. El tamaño de las EVs obtenidas ha sido estudiado mediante *nanoparticle tracking analysis*, microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica.

El trabajo llevado a cabo en el **capítulo 1** de esta tesis doctoral se centra en el análisis comparativo de la carga de proteínas de las EVs, con un tamaño correspondiente a los exosomas, liberadas por las formas infectantes y no infectantes de *T. cruzi*. De igual manera, se estudiaron las diferencias en algunas de sus propiedades nanomecánicas (adhesión, elasticidad y potencial Z), mostrando las EVs liberadas por tripomastigotes un mayor número de proteínas que las formas epimastigotes, especialmente de transialidasas. Además, las EVs liberadas por tripomastigotes mostraron una capacidad de adhesión mayor, así como una elasticidad y rigidez menor, lo que explicaría, la capacidad de las EVs provenientes de las formas



infectantes de interaccionar con las células del mamífero. Los estudios de las modificaciones que estas últimas EVs inducen en la transcriptómica de las células con las que interaccionan han sido estudiados en el **capítulo 2**. En dicho capítulo estudiamos el efecto en la transcripción génica de las células no infectadas tras la interacción con las EVs liberadas por los tripomastigotes. Se comprobó como existe una regulación diferencial de 322 genes celulares (168 genes sobreexpresados y 154 mostraron una reducción de la expresión génica). Entre los genes que se modifican al alza la expresión, destacan los genes relacionados con procesos de ubiquitinación, concretamente con la SUMOilación y una regulación a la baja de los genes implicados en la señalización celular, destacando aquellos que participan en la funcionalidad del citoesqueleto y en el ciclo celular (*RhoA*, *Rac1* y *CDC42*). Estos resultados explicarían trabajos previos de nuestro grupo, donde la interacción con las EVs provenientes de las formas infectantes del parásito interrumpen el ciclo celular en la fase G0/G1 de la célula. Por otra parte, se observó una sobreexpresión de algunos genes implicados en la inhibición de la apoptosis, resultado que fue confirmado mediante citometría de flujo (anexina V-FITC), sugiriendo un efecto antiapoptótico de las EVs segregadas por formas infectivas en células no inmunitarias.

En el **capítulo 3** de esta tesis doctoral se estudió el potencial papel inmunomodulador que ejercen las EVs de los tripomastigotes de *T. cruzi* sobre los macrófagos peritoneales de ratón, bien como EVs libres o bien formando inmunocomplejos con IgGs específicas que reconocen a los antígenos de *T. cruzi*. Además, se evaluó la influencia de la sialización de las IgG que forman los inmunocomplejos, dada la

importancia creciente del papel inmunomodulador ejercido por la presencia del ácido siálico en las IgGs, el cual está mediado por los receptores FcγRs que se encuentran en la membrana de diversas células inmunitarias, entre otras, en los macrófagos. Las células que contienen los citados receptores interactúan con la fracción Fc de las IgG circulantes activando la respuesta inmunitaria; mientras que los receptores FcγRIIb, pertenecientes a este grupo de receptores, ligan las IgGs que poseen ácido siálico en su parte glicosilada, las cuales pueden interactuar con las células inmunitarias también a través de la lectina *siglec* (*Sia-binding Ig-like lectin*), induciendo una respuesta reguladora.

Para el estudio de la inmunomodulación se inocularon EVs, EVs formando inmunocomplejos tanto con IgG sializadas como con IgG no sializadas, como control negativo se inoculó PBS y como control positivo se inocularon tripomastigotes de *T. cruzi* y LPS. Se analizaron las variaciones de las poblaciones de macrófagos peritoneales murinos que tienen lugar tras la inoculación, diferenciándose entre macrófagos peritoneales grandes (LPM), y macrófagos peritoneales pequeños (SPM); estas poblaciones se separaron por citometría de flujo y se analizó el perfil de citoquinas expresado por ambas poblaciones.

Se demostró el aumento de la proporción de la población de SPM y consecuente la disminución de los LPM en la cavidad peritoneal tras la inoculación de EVs libres, así como un aumento aún más evidente tras la inoculación de los inmunocomplejos, tanto en aquellos formados con IgG sializadas como no sializadas. El estudio de la expresión de interleuquinas por parte de las dos poblaciones de

## Resumen

macrófagos pone de manifiesto que las EVs libres tienen un efecto regulador de la activación de la respuesta inflamatoria, en cambio, los inmunocomplejos indujeron una respuesta más proinflamatoria, especialmente los inmunocomplejos formados con IgG no sializadas, demostrando de esta manera el papel antiinflamatorio asociado a la sialización de las IgG.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral demuestran la relevancia del papel protagonizado por las EVs liberadas por las formas tripomastigotes de *T. cruzi* en la supervivencia y mantenimiento del parásito en el hospedador mamífero.

# Summary



*Trypanosoma cruzi* is a flagellated protozoan parasite which causes Chagas disease or American trypanosomiasis. In its life cycle it has haematophagous triatomine insects and mammalian hosts. The disease has an acute phase, followed by a chronic phase in which around 30-40% of patients develop severe cardiac or digestive symptoms.

The obtention and separation of the extracellular vesicles (EVs) employed for this PhD was carried out performing a methodology developed by our research group, which contains procedures of centrifugation, filtration and differential ultracentrifugation from cultures of trypomastigotes of *T. cruzi* from the Pan4 strain, belonging to UDT I. The purity and size of the EVs obtained has been studied by nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy and atomic force microscopy.

The research carried out in **chapter 1** of this doctoral thesis focuses on the comparative analysis of the protein cargo of EVs released by infecting and non-infecting forms of *T. cruzi*. Likewise, the differences in some of their nanomechanical properties (adhesion, elasticity and Z potential) were analysed. The EVs released by trypomastigotes showed a greater number of proteins than the epimastigote forms, especially trans-sialidases. Moreover, EVs released by trypomastigotes showed a higher adhesion capacity, as well as lower elasticity and rigidity, which would explain the ability of EVs from the infecting forms to interact with mammalian cells. The modifications that these latter EVs induce in the transcriptomics of the cells with which they interact were studied in **chapter 2**. In this chapter we analysed the effect on gene transcription in uninfected cells after

## Summary

interaction with EVs released by trypomastigotes. The interaction promoted a differential regulation of 322 cellular genes, 168 genes were overexpressed while 154 genes were downregulated. Genes related to ubiquitination processes were overexpressed, specifically SUMOylation related genes, meanwhile genes involved in cell signalling were downregulated, highlighting those that participate in the functionality of the cytoskeleton and in the cell cycle (*RhoA*, *Rac1* and *CDC42*). These results could explain previous work performed by our group, where the interaction with EVs shed by the infecting forms of the parasite interrupt the cell cycle in the G0/G1 phase of the cell. Moreover, an overexpression of some genes involved in the inhibition of apoptosis was observed, this result was confirmed by flow cytometry (annexin V-FITC), suggesting an antiapoptotic effect of EVs secreted by infective forms in non-immune cells.

In **chapter 3** of this doctoral thesis, the potential immunomodulatory role exerted by EVs released by *T. cruzi* trypomastigotes on mouse peritoneal macrophages was studied, either as free EVs or forming immune complexes with specific IgGs that recognize *T. cruzi* antigens. Furthermore, the influence of the sialylation of the IgGs that form the immune complexes was evaluated, given the growing importance of the exerted by the presence of sialic acid in the IgGs. This immunomodulatory role could be mediated by the FcγRs receptors found in the membrane of macrophages. Cells containing these receptors interact with the Fc fraction of circulating IgG, activating the immune response; while the FcγRIIb receptors, which belong to this group of receptors, bind sialyzed IgGs which can also interact with immune cells also through the lectin siglec (Sia-binding Ig-like lectin), both ways of interaction induce a regulatory response.

To perform the immunomodulatory analysis, free EVs and EVs forming immune complexes with both sialylated IgG and non-sialylated IgG were inoculated. PBS was inoculated as a negative control and *T. cruzi* trypomastigotes and LPS were inoculated as positive controls. The modifications in the populations of murine peritoneal macrophages that occur after inoculation were analysed, differentiating between large peritoneal macrophages (LPM) and small peritoneal macrophages (SPM). These populations were sorted by flow cytometry and the cytokine profiles expressed by both populations were analysed.

An increase in the proportion of the SPM population and a consequent decrease in LPM in the peritoneal cavity occurred after the inoculation of free EVs. An even more evident increase occurred after the inoculation of the immune complexes, both in those formed with IgG sialylated and non-sialylated. The analysis of the expression of interleukins by the two populations of macrophages showed that free EVs have a regulatory effect on the activation of the inflammatory response, whereas, the immune complexes induced a more pro-inflammatory response. Especially with immune complexes formed with non-sialylated IgG, thus demonstrating the anti-inflammatory role associated with the sialylation of IgG.

The results presented in this doctoral thesis demonstrate the relevance of the role played by EVs released by the trypomastigote forms of *T. cruzi* in the survival and maintenance of the parasite in the mammalian host.





# 1. Introducción



La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. El nombre otorgado a la enfermedad se debe al médico e investigador brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, descubridor del parásito en el año 1909 (Chagas, 1909). Hoy en día, tras más de 100 años desde el descubrimiento de dicha enfermedad, la Organización Mundial de la Salud la considera como una enfermedad tropical desatendida (WHO, 2022).

### **1.1. *Trypanosoma cruzi*: características generales y ciclo de vida**

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado, parásito de multiplicación intracelular obligada en los hospedadores vertebrados. La clasificación taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente: reino Protista, filo Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*.

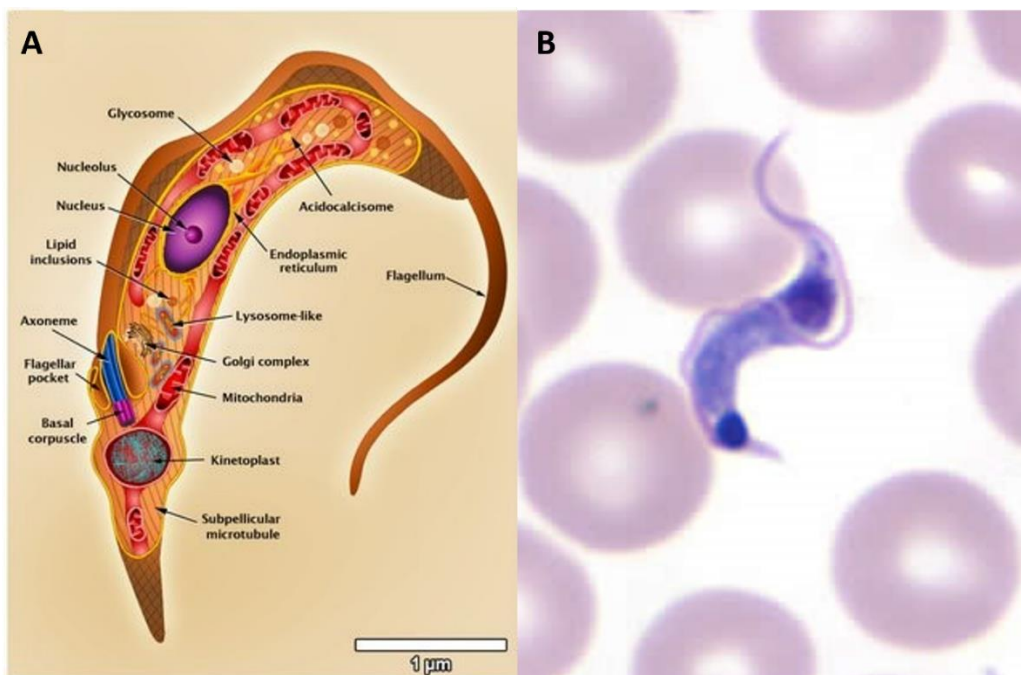
La familia Trypanosomatidae se caracteriza por ser parásitos de animales, plantas u otros protozoos; todos ellos poseen un flagelo libre en algunos de los estadios de su ciclo de vida (Kaufer et al., 2017). Los organismos del orden Kinetoplastida se caracterizan por la presencia de una estructura celular conocida como kinetoplasto; y donde la posición relativa de dicha estructura es empleada para diferenciar entre las distintas fases del parásito y/o especies de tripanosomas (Hamilton & Stevens, 2017). El kinetoplasto consiste en una masa de ADN circular que se encuentra en un ensanchamiento polar de la mitocondria, con un gran contenido de ADN mitocondrial organizado en una serie de círculos a modo de bucles constituyendo

maxicírculos y minicírculos concatenados unos con los otros que dan al kinetoplasto tanto una densidad como estructura peculiar; los maxicírculos poseen ADN que codifica ARN ribosomal así como proteínas mitocondriales relacionadas con el metabolismo energético de la célula; los minicírculos dan lugar a pequeños ARNs involucrados en la en la regulación de la transcripción génica (Kuz'min & Zaitseva, 1986).

*T. cruzi* tiene un ciclo de vida dixeno, involucrando hospedadores invertebrados y vertebrados mamíferos. Los vectores, transmisores del parásito son insectos Hemípteros pertenecientes a la familia Reduviidae, endémicos de América, lo que limita el ciclo salvaje de la enfermedad al continente americano, como explicaremos más adelante.

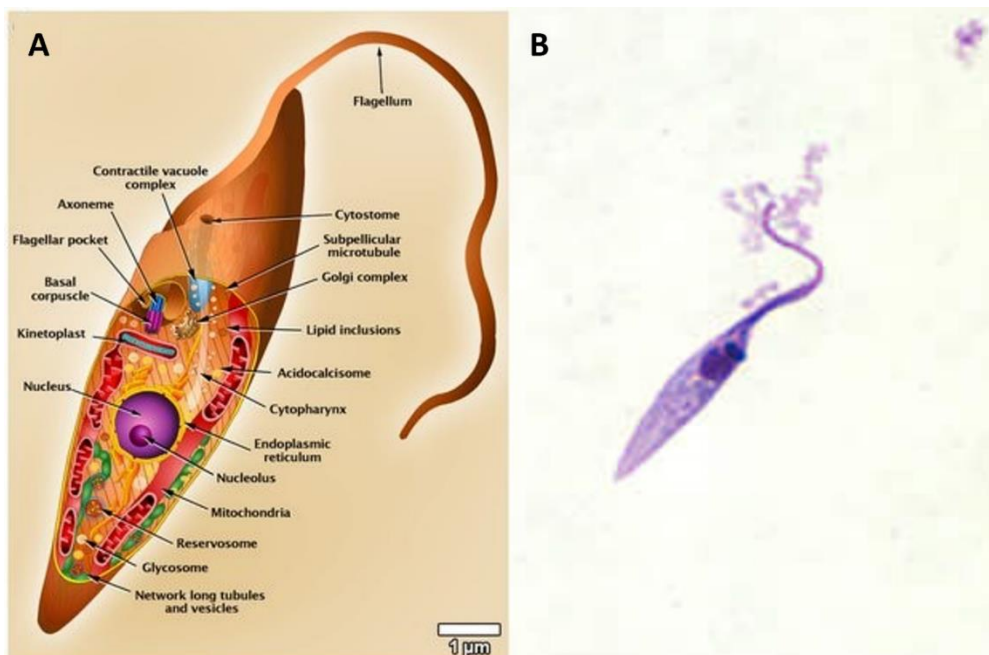
### **Estadios del parásito**

Tripomastigotes sanguíneos: Constituyen uno de los dos estadios infectivos del parásito para los hospedadores vertebrados, se encuentran en el torrente circulatorio del hospedador mamífero y son capaces de infectar todos los tipos de células nucleadas, pero esta forma carece de capacidad replicativa. Los tripomastigotes sanguíneos son alargados, miden de 12 a 20  $\mu\text{m}$  y poseen una membrana ondulante entre el flagelo y la membrana plasmática; el flagelo parte del corpúsculo basal y emerge como libre en la parte posterior del parásito. Los tripomastigotes de *T. cruzi* se caracterizan por la situación del kinetoplasto, el cual se encuentra en el extremo posterior del parásito, en la zona terminal (D. E. Teixeira et al., 2012; Tyler & Engman, 2001) (Figura 1).



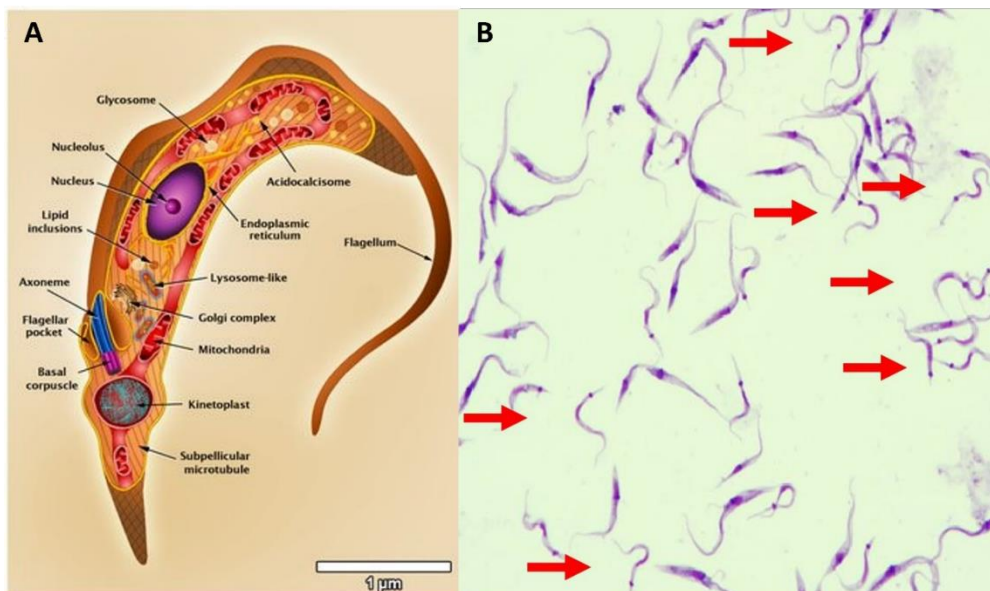
**Figura 1. Morfología de formas tripomastigotes de *T. cruzi*.** A: Ilustración esquemática de la morfología del parásito y de la disposición aproximada de los orgánulos contenidos en las formas tripomastigotes. Imagen obtenida de (D. E. Teixeira et al., 2012) con permiso de la editorial PLoS. B: Tinción de Giemsa de un frotis sanguíneo de un hospedador mamífero infectado por *T. cruzi*. Imagen obtenida de DPDx, perteneciente a *Centers for Diseases Control and Prevention*: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.

**Epimastigotes:** los epimastigotes son formas flageladas y con capacidad replicativa, se desarrollan en la región anterior del intestino del insecto vector. Su tamaño es mayor que los tripomastigotes, está comprendido entre los 20-40  $\mu\text{m}$ ; presentan una membrana ondulante, aunque menos desarrollada que en los tripomastigotes, con un flagelo dirigido hacia la parte anterior del cuerpo de protozoo. En el caso de los epimastigotes de *T. cruzi*, el kinetoplasto se encuentra entre el núcleo y el corpúsculo basal (D. E. Teixeira et al., 2012; Tyler & Engman, 2001) (Figura 2).



**Figura 2. Morfología de formas epimastigotes de *T. cruzi*.** A: Ilustración esquemática de la morfología del parásito y de la disposición aproximada de los orgánulos presentes en las formas epimastigotes. Imagen obtenida de (D. E. Teixeira et al., 2012) con permiso de la editorial PLoS. B: Tinción de Giemsa de un epimastigote de *T. cruzi*. Imagen obtenida de DPDx, perteneciente a *Centers for Diseases Control and Prevention*: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.

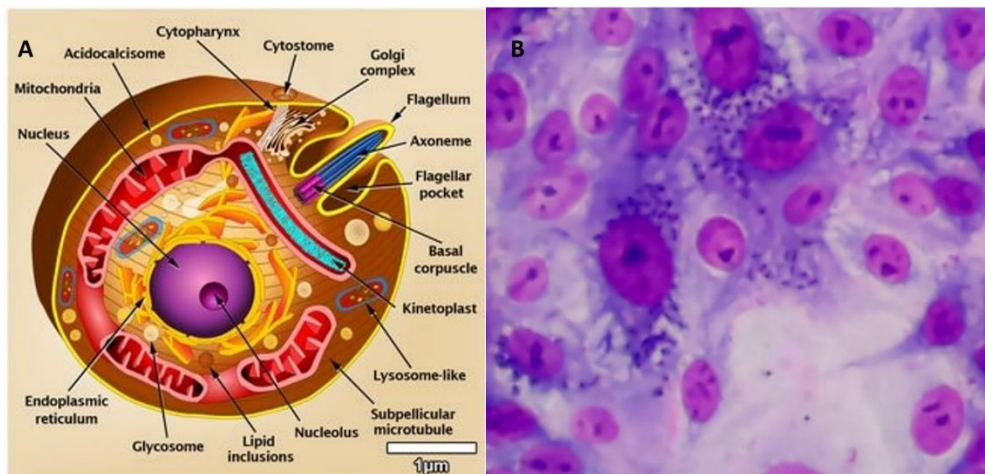
Tripomastigotes metacíclicos: al igual que los tripomastigotes sanguíneos, son infectivos y no son replicativos. En cambio, los tripomastigotes metacíclicos se diferencian a partir de las formas epimastigotes al alcanzar en el insecto vector la región posterior del intestino y la ampolla rectal. Su morfología es similar a la de los tripomastigotes sanguíneos, pero más esbeltos, con un flagelo más corto y con una membrana ondulante menos evidente (D. E. Teixeira et al., 2012; Tyler & Engman, 2001) (Figura 3).



**Figura 3. Morfología de formas tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*.** A: Ilustración esquemática de la morfología del parásito y de la disposición aproximada de los orgánulos presentes en las formas tripomastigotes. Imagen obtenida de (D. E. Teixeira et al., 2012) con permiso de la editorial PLoS. B: Tinción de Giemsa de un cultivo mixto de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos (marcados) de *T. cruzi*. Imagen obtenida de (Gluezn et al., 2007) con permiso de la editorial Elsevier.

**Amastigotes:** este estadio constituye la fase intracelular del parásito en el hospedador mamífero. Su morfología es redondeada, su tamaño comprende entre los 3–6 µm. Los amastigotes poseen un flagelo muy reducido, casi imperceptible el cual no es visible mediante microscopía óptica. En esta fase los parásitos se dividen activamente completando su ciclo de división cada 12 horas aproximadamente, aunque este tiempo varía, dependiendo de la cepa. Tras una serie de replicaciones, los parásitos se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, lisan la célula y quedan expuestos al medio extracelular (D. E. Teixeira et al., 2012; Tyler & Engman, 2001) (Figura 4).





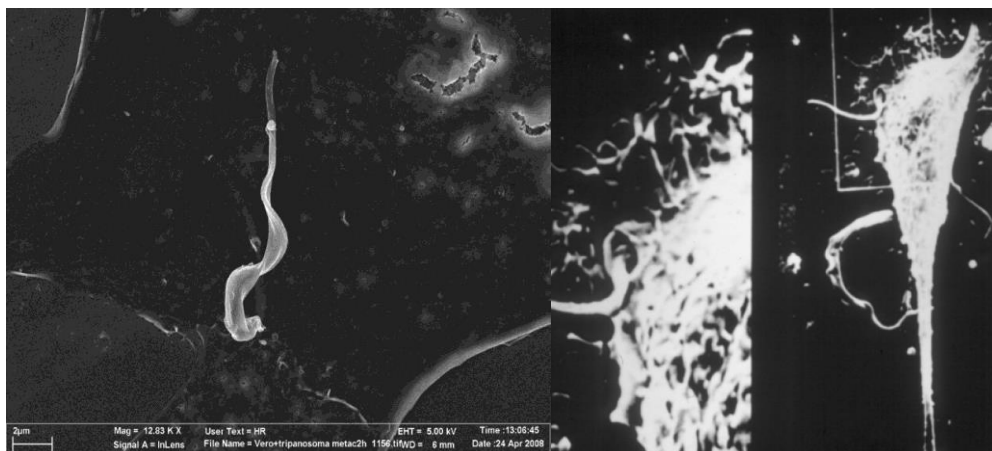
**Figura 4. Morfología de formas amastigotes de *T. cruzi*.** A: Ilustración esquemática de la morfología del parásito y de la disposición aproximada de los orgánulos presentes en las formas amastigotes. Imagen obtenida de (D. E. Teixeira et al., 2012) con permiso de la editorial PLoS. B: Tinción de Giemsa de un cultivo de células Vero infectada con amastigotes de *T. cruzi*.

### **Ciclo de vida**

El ciclo de vida comienza cuando el hemíptero hematófago, perteneciente a la familia Reduviidae ingiere sangre de un mamífero infectado, en cuya sangre se encuentran tripomastigotes sanguíneos, los cuales, tras ser ingeridos son capaces de diferenciarse a formas epimastigotes en el intestino anterior del insecto. Los epimastigotes migrarán al intestino medio del vector y se dividirán por fisión binaria, una vez alcanzado el intestino posterior, los parásitos se adhieren a las membranas de las células intestinales del hospedador, donde comienza su diferenciación a tripomastigotes metacíclicos, que vuelven al lumen intestinal, migran hasta el recto y serán liberados con las heces del insecto.

Durante la ingestión de sangre de un mamífero por parte del insecto, este defeca y orina, liberando junto a las excretas los tripomastigotes

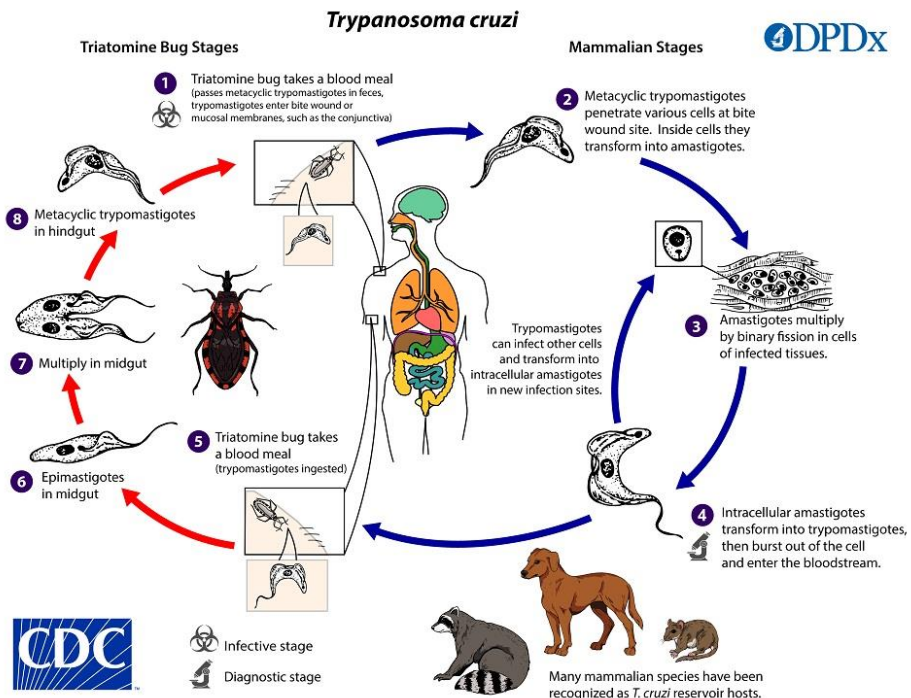
metacíclicos infectivos; los cuales entran en contacto con la mucosa del hospedador o a través de las discontinuidades de la piel producidas por la picadura, o el rascado, e infectan cualquier tipo de célula nucleada presente en las mucosas o del epitelio del mamífero. Los tripomastigotes se adhieren a la membrana celular y se internalizan en las células por endocitosis, tras formar una vacuola parasitófora (Figura 5).



**Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del proceso de adhesión (A) e infección celular (B) por tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*.** Imagen extraída de (Osuna et al., 1993).

Transcurrido un tiempo variable y dependiente de la cepa de parásito, los tripomastigotes serán capaces de escapar de la vacuola y acceder directamente al citosol. Como se ha indicado, el tiempo necesario para escapar de dicha vacuola dependerá de la virulencia de la cepa del parásito (L. O. Andrade & Andrews, 2004; Cardoso et al., 2016; Ley et al., 1990). Ya en el citosol, los parásitos se diferenciarán en amastigotes, los cuales se dividirán por fisión binaria durante 72-120 horas, y se diferenciarán en tripomastigotes sanguíneos induciendo la lisis celular, quedando las formas tripomastigotes libres en los

espacios intercelulares, accediendo al torrente linfático o circulatorio infectando otras células o bien ser ingeridos por un triatomino transmisor, cerrando de esta manera el ciclo de vida del parásito (Tyler & Engman, 2001) (Figura 6). La transmisión vectorial se lleva a cabo tanto en los ciclos de vida selváticos como en los domésticos o peridomésticos, teniendo en cuenta que los hospedadores mamíferos en los que se cierra el ciclo son diferentes. Mientras que en el ciclo de vida salvaje existen más de 100 especies de mamíferos potencialmente reservorios para *T. cruzi*, desde marsupiales, murciélagos, roedores, armadillos, conejos, cánidos, félidos y primates, en los ciclos domésticos y peridomésticos los reservorios más habituales son los cánidos (Coura, 2015).



**Figura 6. Ciclo de vida de *T. cruzi*.** Imagen obtenida de DPDx, perteneciente a Centers for Diseases Control and Prevention: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamericana/index.html>

Las vías de transmisión se pueden clasificar como i) naturales entre las que se encuentra la vía mediada por los triatomíneos, la transmisión vertical transplacentaria y la transmisión oral y ii) métodos no naturales como la transmisión por transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos.

- a) La vía de transmisión congénita se debe al hecho de que los parásitos que infectan a la madre son capaces de atravesar, de forma aun no del todo comprendida, la barrera placentaria durante el embarazo contaminando el torrente circulatorio y los tejidos del feto durante el desarrollo fetal o en el momento del nacimiento. Esta vía de transmisión ocurre en aproximadamente en el 5% de las madres infectadas. El éxito o fracaso de esta transmisión, se considera multifactorial, dependiendo de la cepa del parásito así como de la impronta genética de la madre y el feto (Kemmerling et al., 2019). En la actualidad se estima que hay 1,12 millones de mujeres en edad fértil infectadas y cada año nacen unos 9.000 bebés infectados, constituyendo la vía de infección mayoritaria en países donde no se puede completar el ciclo biológico por la ausencia de vectores (Schijman et al., 2022).
- b) La infección oral ocurre tras la ingestión de alimentos contaminados con heces de insectos vectores o bien con los mismos insectos triturados accidentalmente en zumos, o bien con las secreciones de reservorios silvestres contaminados, como es la orina de las zarigüeyas infectadas, en la cual se encuentran formas tripomastigotes “*slender*” similares a los tripomastigotes metacíclicos. La mayoría de las infecciones orales descritas se deben a la ingesta de jugos de frutas y

otras bebidas infectadas. En ocasiones, la infección oral presenta manifestaciones clínicas más graves que la infección vectorial, pudiendo presentar en la fase inicial de la enfermedad, edemas faciales, gingivales, y linguales además de manifestaciones severas incluso en la fase aguda de la enfermedad como son la miocarditis aguda, esplenomegalia, hepatomegalia; probablemente debido a que la carga infectiva sea mayor en las infecciones orales, ya que se ha calculado que mientras que en las deposiciones de las chinches existen entre 3000-4000 formas metacíclicas, en el intestino del insecto adulto pueden encontrarse alrededor de 650000 formas infectivas (Noya et al., 2015; Schaub, 1989). Generalmente, esta vía de infección se caracteriza por originar brotes de infección, donde grupos de personas (familiares, niños de escuelas, etc.) ingieren el alimento contaminado, de hecho, en algunas zonas (Venezuela y Amazonia Brasileña) se considera que la vía oral podría ser la vía de infección mayoritaria. La infección por vía oral es también constituye la vía mayoritaria dentro de los animales insectívoros que actúan como reservorios, lo que permite al parásito mantenerse en los ciclos selváticos como es el caso de Estados Unidos, donde la etología de los triatominos hace imposible la infestación humana, al no defecar el insecto durante la ingesta de sangre (E. F. Santos et al., 2020; Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Yoshida, 2009).

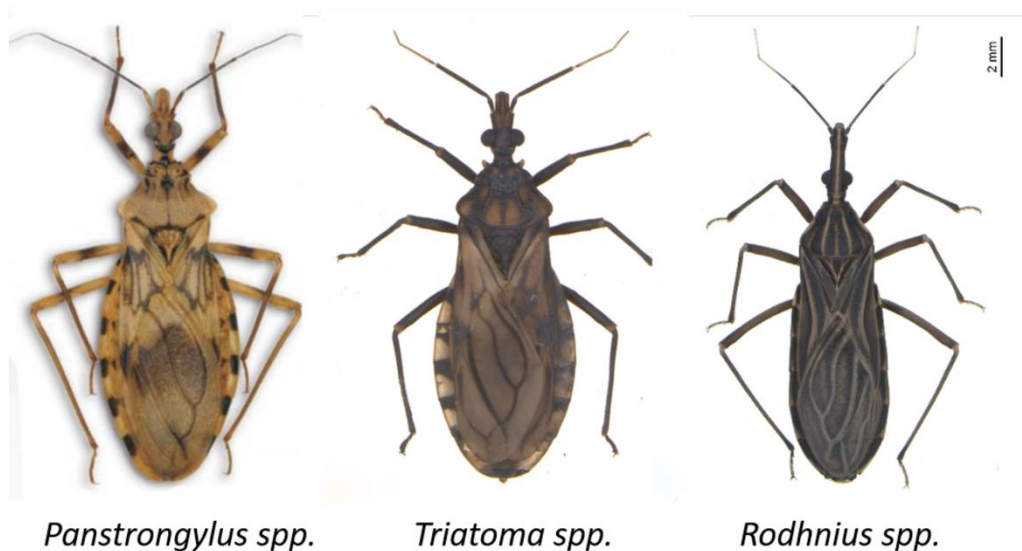
- c) La infección por transfusión sanguínea o trasplante de órganos ocurre en el caso en que el donante de la sangre o del órgano esté infectado por *T. cruzi*, por lo que la sangre o el órgano a

trasplantar será el modo de transmisión del parásito. Es importante tener en cuenta que la inmunosupresión que acompaña a los trasplantes de órganos hace de esta, una vía de infección muy peligrosa (Gómez et al., 2019). Con objeto de prevenir la transmisión, numerosos países entre los que se encuentra España (Real Decreto 1088/2005) han establecido una serie de normativas estrictas para la donación, en la que es obligatorio una serie de análisis del parásito en sangre y órganos cuando los donantes provienen de zonas endémicas, siendo España el primer país europeo en tomar dichas medidas (Navarro et al., 2022).

### **Epidemiología**

En la actualidad se estima que hay entre 6 y 8 millones de infectados, diagnosticándose al menos unos 30000 nuevos infectados anualmente, que provocan alrededor de 12000 muertes anuales; y donde la OMS - OPS estima que existen unos 70 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2022).

Se han descrito en el continente americano más de 140 especies de triatominos, reconocidos como potenciales vectores del parásito, estos triatominos pertenecen a 19 géneros diferentes, entre ellos destacan *Panstrongylus sp.*, *Rhodnius sp.* y *Triatoma sp.* (Figura 7) (Galvao et al., 2016).



**Figura 7.** Fotografías de tres diferentes géneros de insectos hematófagos transmisores de la enfermedad de Chagas. Fotografías obtenidas de la Colección de Triatominos de la Universidad Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

La enfermedad de Chagas se considera endémica de Latinoamérica debido a que la vía de infección del parásito requiere de la presencia del vector, el cual se encuentra extendido por 22 países del continente americano (F. L. N. Santos et al., 2016) (Figura 8).

Los triatominos vectores se desarrollan en oquedades de la vegetación, árboles y palmeras, rincones, oquedades y grietas en las paredes y techos de viviendas construidas de adobe y vegetales, en las áreas rurales o en los barrios marginales que rodean las ciudades de América Latina (WHO, 2022). Las viviendas en condiciones mejorables se asocian con tasas significativamente más altas de infestación, de hecho, la mayoría de las viviendas infestadas son de adobe, con techos de palma y bahareque (paredes hechas con troncos y barro) o tienen el suelo sin pavimentar y las paredes sin enlucir (Bustamante Zamora et al., 2015) (Figura 9).

Las poblaciones de *T. cruzi* son policlonales, presentando una alta variabilidad genética que ha llevado a su clasificación en siete Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) diferenciándose en Tc I - Tc VI más la Tcbat cepa aislada de los murciélagos y con características idénticas a *T. cruzi* (Lima et al., 2015; Zingales et al., 2009, 2012).

Las diferentes UDTs, poseen diferentes marcadores genéticos específicos para cada UDT (Risso y col, 2011; Cura y col, 2015; Tavares de Oliveira y col, 2018). Los UDTs muestran distinta distribución geográfica, diferente tropismo en los órganos y células del mamífero infectado, pudiendo asociárseles con las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas, así como mostrar diferentes respuestas a fármacos (Burgos et al., 2010; Cura et al., 2010; Zingales et al., 2012). La UDT mayoritaria en toda la zona endémica es la Tc I. Los porcentajes aproximados de UDTs de forma global sería 58.2% para la TcI, 16.3% TcV, 10,4% para TcII, 7.8% para la TcVI, 3.6% para la TcIII, y 2,4% TcIV y solamente 1.1% para la UDT Tcbat.

En Centroamérica mayoritariamente los aislados humanos son TcI (93.3%), Tc IV (6.7%), recientemente en Panamá se han descrito casos de TcI, TcII, TcV y TcVI infectando a los mismos pacientes, quizás como consecuencia de reinfecciones por sobreexposición a diferentes picaduras de los vectores. Por último, en Norteamérica (México y sur de Estados Unidos) se encuentra TcI (79.5%), TcIV (14.20%), TcII (2.80%), TcV (1.96%) y TcIII (1.53%) (Brenière et al., 2016; Prescilla-Ledezma et al., 2021). Las diferencias genéticas de los parásitos, de los vectores y las diferencias sociológicas y

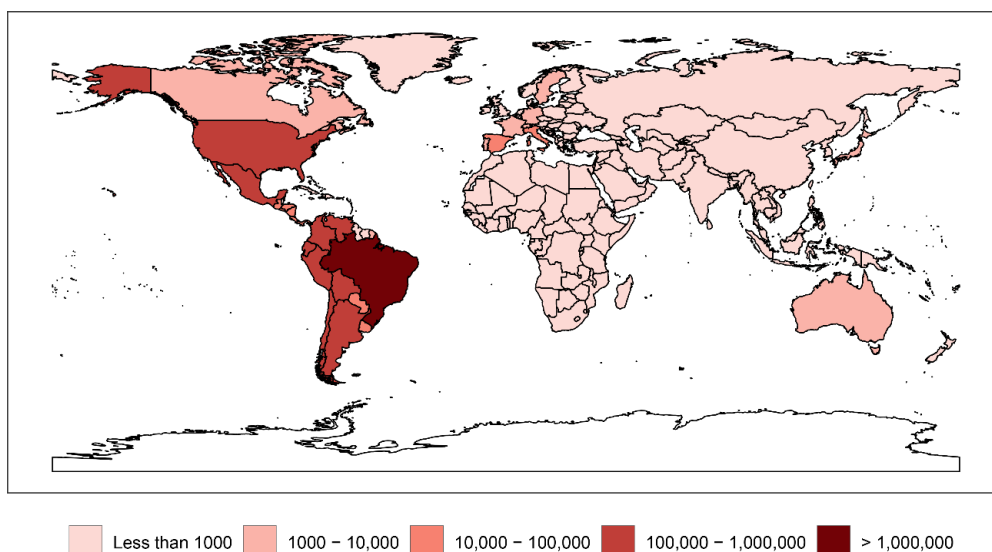


## Introducción

culturales hacen que la epidemiología de la infección sea diferente en cada país.

Así en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay, Venezuela, Colombia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá la enfermedad presenta ciclos biológicos, los ambientes domésticos, peridomésticos y salvajes (Coura & Viñas, 2010).

Mientras que, en Belice, Guayana Francesa, Guayana, Surinam, México y Estados Unidos aparentemente se encuentran únicamente con ciclos biológicos en ambientes salvajes (Coura & Viñas, 2010)



**Figura 8. Distribución global de los casos de enfermedad de Chagas en el año 2017.** Imagen obtenida de (Hotez et al., 2020) con permiso de la editorial PLoS.

A pesar de que la transmisión por la picadura del insecto no es particularmente eficiente, en las regiones donde los triatominos son insectos habituales del entorno doméstico (Figura 8), la transmisión vectorial es el principal modo de infección.

La exposición repetida a las picaduras provoca el aumento constante de la prevalencia a lo largo del tiempo, especialmente en los niños menores de 5 años donde las picaduras y el contacto con los insectos son habituales, incluso por los juegos y donde las poblaciones de triatominos crían en el interior de las viviendas y se alimentan e infectan de los animales domésticos o peridomésticos. Las costumbres de coprofagia, y canibalismo de las larvas de los triatominos respecto a los insectos adultos favorece la expansión de *T. cruzi* en las poblaciones de los insectos, aumentando así las probabilidades de infección entre los habitantes de los domicilios donde se desarrollan y se esconden (Dorn et al., 2003; Nouvellet et al., 2013; WHO, 2022).



**Figura 9. Imágenes de viviendas rurales con mayor tendencia a presentar infestación de insectos vectores.** a: Casa rural guaraní de la región del Chaco Boliviano. b: Casa rural quechua en los valles interandinos. c: Zona periurbana cercana a una casa guaraní en Isoso (Bolivia). d: Interior de una vivienda rural quechua con recursos limitados. Imagen obtenida de (Salm & Gertsch, 2019) con permiso de la editorial Springer Nature.

En zonas endémicas, la aplicación de agentes insecticidas en las áreas domésticas y peridomésticas permite el control de la transmisión vectorial. El control vectorial a nivel internacional ha permitido una reducción en las tasas de transmisión de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur del continente sudamericano: Argentina, Chile, Brasil, Paraguay y Uruguay donde se aplicó periódicamente la desinsectación de las áreas domésticas y peridomésticas (Feliciangeli et al., 2003; Gürtler et al., 2005).

Los niveles más altos de parasitación por *T. cruzi* se encuentran en lugares como el Chaco Boliviano, zonas de Brasil, así como en América Central, donde se estima que se encuentran actualmente unos dos millones de personas infectadas y 26 millones más en riesgo severo de contagio, lo cual constituye aproximadamente el 11% de los infectados para toda América (Moncayo & Silveira, 2009; Samuels et al., 2013). En un estudio realizado en Guatemala se ha descrito como los niveles de presencia de los triatominos van desde el 4% al 50% de las casas estudiadas dependiendo de la zona, y que entre el 30-60% de los insectos capturados estaban infectados con *T. cruzi* (Dorn et al., 2003). Asimismo, un estudio de la prevalencia de la enfermedad de Chagas realizado en zonas rurales de Brasil arrojó una prevalencia superior al 12%, con una edad media de los individuos seropositivos de 55 años, la mayoría eran trabajadores

agrícolas, con escasos estudios primarios y/o analfabetos. Cuando la población de estudio residía en un núcleo urbano en el noreste de Brasil la prevalencia se redujo hasta un 4.2%, de los cuales la prevalencia fue de 6 veces mayor entre quienes habían vivido previamente en zonas rurales, mientras que la educación superior se asoció con una menor tasa de prevalencia (E. C. Freitas et al., 2017; Glass et al., 2018). Estudios similares llevados a cabo en Panamá dieron resultados similares, donde la población rural de una zona seleccionada y considerada endémica, dio una positividad del 42.3% de los que el 9.09% correspondían a infecciones mixtas de *T. cruzi* con DTUs (TcI y TcII/V/VI) lo que indica como se ha dicho anteriormente, infecciones repetidas por parte del parásito (Prescilla-Ledezma et al., 2021).

A pesar de que la enfermedad se considera endémica de Latinoamérica, y debido a los flujos migratorios provocados por la globalización, hoy en día se pueden encontrar pacientes infectados en prácticamente la totalidad de los países de mundo (Figura 8). De hecho, se han descrito casos en Europa, Asia, Oceanía y América del Norte. Solo en Europa se estima que hay más de 100000 personas infectadas, de las cuales la mayor parte se encuentran en España (aproximadamente 60000) (Navarro et al., 2022). A pesar de que en estos países fuera de las regiones endémicas no se produce la transmisión del parásito por vía vectorial, debido a la ausencia del vector, si pueden ocurrir nuevas infecciones vía congénita, transfusional o por trasplante de órganos como de hecho ha ocurrido con relativa frecuencia (Gómez-Ochoa et al., 2022; Navarro et al., 2012, 2022)

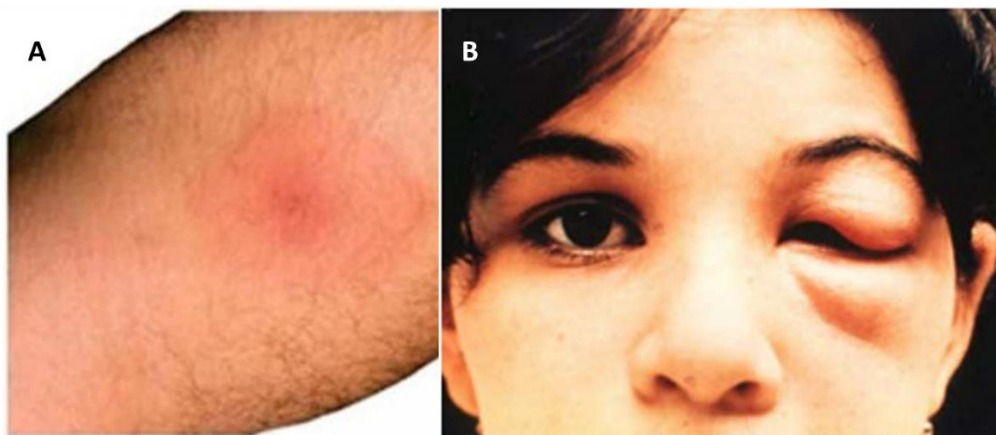
## 1.2. Enfermedad de Chagas:

### **Sintomatología y manifestaciones clínicas**

Las personas afectadas por la enfermedad de Chagas presentan dos fases bien diferenciadas de la enfermedad: una primera fase llamada fase aguda, que se caracteriza por una alta parasitemia en sangre, la cual desencadena una fuerte estimulación del sistema inmunitario que posteriormente va a disminuir significativamente la parasitemia pero, sin embargo, no es capaz de resolver ni la infección ni la enfermedad.

La fase aguda comienza con la infección por *T. cruzi* pudiendo durar entre 8 y 12 semanas, en las cuales el 95% de los pacientes permanecen asintomáticos o con síntomas muy leves e inespecíficos, tales como fiebre, cefalea, diarrea, vómitos y malestar generalizado. Aunque aproximadamente el 5% de los pacientes muestran una sintomatología grave que incluye esplenomegalia, miocarditis aguda y meningoencefalitis, especialmente si el paciente sufre una comorbilidad con alguna patología inmunosupresora (D. V. Andrade et al., 2014; R. C. N. Melo, 2009). Algunos pacientes, cuando la infección ha tenido lugar tras la picadura del insecto vector, desarrollan un signo muy característico conocido como “Chagoma”, el cual consiste en un granuloma que aparece en la zona de la entrada de los parásitos tras la picadura de la chinche, al cabo de algunas semanas o meses se elimina el granuloma pero queda una marca pigmentada en la piel muy característica (Théry et al., 2018) semejante a un chancro. La otra manifestación cutánea que se relaciona con la infección *T. cruzi*, es el signo de Romaña, el cual se manifiesta cuando la picadura se produce cercana a la conjuntiva del

ojo, originando un edema muy característico (Chagas, 1909) (Figura 10).



**Figura 10.** A: Fotografía de un chagoma, una manifestación resultante de la picadura de una chinche. B: Signo de Romaña, ocurre cuando la picadura de la chinche se realiza cercana a la conjuntiva ocular. Imagen obtenida de *Centers for Diseases Control and Prevention*: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>.

En la fase crónica de la enfermedad, la parasitemia disminuye drásticamente, en esta fase los métodos parasitológicos directos de detección del parásito suelen ser negativos y los pacientes suelen ser asintomáticos durante años o décadas (normalmente 20-30 años), incluso hay pacientes que no desarrollan ninguna sintomatología patognomónica asociada a la enfermedad en toda su vida. En cambio, el 30-40% de los pacientes crónicos acaban, al cabo de los años, con manifestaciones clínicas propias de la enfermedad, las cuales pueden llegar a ser de una severidad considerable son las denominadas patías chagásicas. El 30% de los pacientes desarrollan una cardiopatía chagásica crónica (CCC), mientras que el 5-10% restante muestran alteraciones a nivel del sistema digestivo dando

## Introducción

lugar a las manifestaciones “mega” (megaesófago, megacolédoco, megacolon).

La cardiopatía chagásica crónica constituye la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad de Chagas, es una miocardiopatía inflamatoria que puede progresar a miocardiopatía dilatada con insuficiencias cardíacas, arritmias ventriculares, trastornos de la conducción, que pueden desencadenar accidentes cerebrovasculares, embolias sistémicas o pulmonares incluso la muerte súbita. La miocardiopatía chagásica dilatada se refiere al patrón hemodinámico de la CCC, caracterizado por el agrandamiento del ventrículo izquierdo (VI) con deterioro de la función sistólica global o segmentaria. Varios estudios describen que la insuficiencia cardíaca por CCC tiene un peor pronóstico en comparación con otras miocardiopatías, como la miocardiopatía isquémica y la miocardiopatía dilatada idiopática (Bestetti & Muccillo, 1997; Machado et al., 2012; P. C. Teixeira, 2012). Las manifestaciones patológicas de la CCC resultan de anomalías en la conductividad eléctrica, disfunción contráctil del miocardio, arritmias o tromboembolismo (M. M. Teixeira, 2003). También se ha descrito en la enfermedad de Chagas avanzada, que la aparición de una dilatación significativa del VI acompañada de una depresión de la función sistólica global del VI, lo que se correlaciona directamente con el riesgo de muerte (J. P. de Andrade et al., 2011). En pacientes de la enfermedad de Chagas, la causa de muerte más común es la muerte súbita (55-60%), seguida de insuficiencia cardíaca (25-30%) y eventos embólicos (10-15%) (Rassi Jr et al., 2001, 2009).

Las principales manifestaciones clínicas digestivas son debidas a la disperistalsis del esófago y del colón, probablemente debido a la destrucción del plexo nervioso mientérico y de esta manera, provocando la aparición de dilataciones del digestivo, los conocidos como megacolon y megaesófago (megasíndromes) que consisten en una inflamación y dilatación progresiva de dichos órganos dando lugar, además, a alteraciones del flujo gástrico (Rassi et al., 2012).

El megaesófago es claramente más frecuente en varones y se diagnostica cuando los pacientes sufren una disfagia que les hace acudir a revisión médica, mientras que el megacolon se presenta en mayor medida en mujeres y se diagnostica cuando las pacientes sufren constipación, fecaloma o vólvulo intestinal. El megacolon se caracteriza por una dilatación intestinal asociada con una infiltración de células linfoides exacerbada: macrófagos, linfocitos T CD3+, linfocitos B CD20+, células NK y mastocitos (Corbett et al., 2001).

### **Diagnóstico**

Las técnicas de diagnóstico óptimas para la detección de la enfermedad de Chagas dependen de la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente en el momento de realizar el diagnóstico. Pese a que en la actualidad existen diversas herramientas sensibles y específicas para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas, la realidad es que en los centros sanitarios de zonas endémicas, y ante las sospechas de que un paciente se encuentre en la fase aguda de la enfermedad, las técnicas de diagnóstico utilizadas siguen siendo las correspondientes al diagnóstico parasitológico clásico, la observación directa de las formas del parásito en sangre. Pudiendo realizarse la observación



directa de las muestras de sangre en fresco, o empleando técnicas de concentración como el método de Strout o la técnica del micrométodo. En los centros de referencia se pueden realizar otras técnicas más complejas como son el xenodiagnóstico con triatominos mantenidos en insectarios, el hemocultivo o el xenodiagnóstico en animales de laboratorio (Luquetti et al., 2003; Schijman et al., 2022).

Cuando mediante las técnicas parasitológicas clásicas no se puede realizar un diagnóstico certero, se puede recurrir a la realización de métodos diagnósticos moleculares. El diagnóstico se puede realizar mediante la amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, una técnica que permite un diagnóstico cualitativo (PCR a tiempo final) y cuantitativo (PCR a tiempo real, rtPCR o qPCR), pudiendo obtenerse el ADN a partir de una muestra de sangre de la paciente tratada con un agente caotrópico como la guanidina. El amplicón de estudio será un fragmento del ADN satélite o de ADN del kinetoplasto (Avila et al., 1993; Schijman et al., 2011). Pudiéndose de igual manera llevar a cabo metodologías mixtas de xenodiagnóstico acopladas a PCR en las heces del triatomo (Zulantay et al., 2007), o acopladas a métodos de concentración como es el denominado como el *Buffy coat* (Liempi et al., 2024).

De igual manera, se puede realizar el diagnóstico mediante la amplificación isotérmica o LAMP (del inglés, *Loop-Mediated Isothermal Amplification*). Esta técnica permite amplificar grandes cantidades de ADN en un periodo de entre 30 y 60 minutos de incubación a una temperatura constante de 60-65°C, empleando reactivos que pueden almacenarse a temperatura ambiente, y

pudiéndose realizar la lectura sin necesidad de ningún equipo específico, todas estas propiedades hacen de LAMP una técnica muy accesible en algunas zonas endémicas en las que los recursos de los sistemas sanitarios son muy limitados (Besuschio et al., 2017; Longhi et al., 2023; Notomi, 2000; Rivero et al., 2017).

Durante la fase crónica de la enfermedad y dada la escasa presencia de parásitos en sangre, el diagnóstico se realiza mediante test serológicos, basados en la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente que reconocen antígenos de *T. cruzi*, la mayoría de las pruebas se centran en detectar la presencia de IgG específica. Existen numerosos diagnósticos serológicos, como son la hemaglutinación, inmunofluorescencia, ELISA o test rápidos inmunocromatográficos; estos test presentan una especificidad y sensibilidad razonable teniendo en cuenta el bajo coste y consumo de tiempo requerido (Barfield et al., 2011; Luquetti et al., 2003; Rodrigues et al., 2022). Dentro de estas técnicas inmunológicas, en opinión de Schijman y colaboradores la hemaglutinación es la técnica más sencilla y económica, con pocos pasos, mostrando una buena especificidad (>98%) y sensibilidad (>96%) (Schijman et al., 2022). Por su parte, la inmunofluorescencia, implica numerosos pasos de incubación, requiere un microscopio de fluorescencia y personal capacitado para su manejo, pese a que posee una alta sensibilidad (>99%), su especificidad es menor que la hemaglutinación (>96%), pudiendo presentar reacciones cruzadas con *Leishmania* y otros tripanosomátidos como *T. rangeli* (F. L. N. Santos et al., 2016; Schijman et al., 2022). La situación es similar con las técnicas inmunoenzimáticas, la ELISA es una técnica muy sensible, pero no presenta una especificidad óptima, depende de los antígenos que se

## Introducción

utilicen e incluso de su procedencia geográfica y requiere de numerosos pasos de incubación, aunque el resultado es más objetivo que las técnicas previamente mencionadas (Brasil et al., 2010; Schijman et al., 2022).

La OMS recomienda que para el diagnóstico sea considerado positivo con las técnicas de diagnóstico serológicas, la muestra debe ser positiva en al menos dos técnicas serológicas diferentes (WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease, 2002) y a ser posible con antígenos provenientes de parásitos de zonas geográficas diferentes.

Sin embargo, la persistencia de las inmunoglobulinas específicas a lo largo de la vida del paciente, limita que estas técnicas sean capaces de valorar la presencia del parásito especialmente tras el tratamiento de los pacientes o en niños recién nacidos.

### **Tratamiento y control de la transmisión**

Actualmente, solo hay dos fármacos disponibles para el uso clínico en la enfermedad de Chagas, Benznidazol y Nifurtimox, siendo ambos fármacos nitroheterocíclicos desarrollados hace décadas por Roche y Bayer, respectivamente, con actividad biocida frente a *T. cruzi*. Estos fármacos se consideran prodrogas, ya que requiere de la metabolización de las mismas por parte del parásito para ejercer el efecto tóxico, lo que ha permitido a los parásitos desarrollar mecanismos de resistencia a estos fármacos (Vázquez et al., 2017; Wilkinson et al., 2008).

Estos fármacos muestran una elevada efectividad si el tratamiento se inicia durante la fase aguda de la enfermedad. El tratamiento muestra

una alta eficacia en neonatos infectados, y una baja toxicidad en niños, considerándose bien tolerado. Sin embargo, en jóvenes y adultos estos fármacos tienden a provocar efectos tóxicos, que conllevan a una elevada tasa de abandono del tratamiento. Se ha descrito la importancia del tratamiento de mujeres infectadas durante el embarazo, debido a que el tratamiento administrado consigue reducir la parasitemia en la madre, y con ello las posibilidades de transmisión transplacentaria de la enfermedad disminuyen. Por el contrario, se han descrito eficiencias muy bajas en el tratamiento de pacientes en fase crónica, fase en la cual se realizan la mayor parte de los diagnósticos, por lo tanto, es prioritario para los pacientes de la enfermedad de Chagas el estudio con tratamientos alternativos que posean una eficiencia mayor en esta fase de la enfermedad (Paulino et al., 2005; Vázquez et al., 2017).

En la actualidad existen ensayos clínicos que analizan posibles modificaciones en el régimen de tratamiento dependiendo de la edad del paciente, así como del estadio de la enfermedad, que maximicen el efecto tripanocida del tratamiento y minimicen los efectos tóxicos de los fármacos administrados. En este contexto, se realizó un proyecto titulado «Benznidazol and triazol research group for nanomedicine and innovation on Chagas disease» (BERENICE) centrado en el desarrollo de una nueva formulación farmacológica para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, mediante la encapsulación del benznidazol, obteniendo un sistema de administración dirigida del fármaco minimizando así los efectos secundarios.

Además del tratamiento de las personas infectadas, la transmisión de la enfermedad de Chagas se puede controlar mediante la eliminación de las poblaciones de vectores, así como haciendo un control de donantes para transfusiones o trasplantes y madres infectadas.

El control vectorial se ha realizado en numerosos países endémicos, obteniendo muy buenos resultados a corto plazo tras la fumigación de las zonas domésticas y peridomésticas con insecticidas piretroides como son la deltametrina (Coura & Viñas, 2010; Feliciangeli et al., 2003; Gürtler et al., 2005; Ribeiro-Jr et al., 2022). Este control debe hacerse con fumigaciones periódicas cada 6 meses, aunque se debe tener en cuenta que la fumigación generalizada de grandes zonas presenta numerosas contraindicaciones, especialmente medioambientales, entre otras la contaminación de ríos y embalses que posteriormente son utilizados para agua de bebida o riego, incorporándose de esta manera en las cadenas alimenticias. Por otra parte, la exposición repetida de los insectos a un insecticida puede desencadenar la pérdida de eficacia del mismo debido al desarrollo de resistencia por parte de los insectos. De igual forma, la fumigación masiva puede llevar a la eliminación de enemigos naturales del insecto que se pretende controlar, aumentando la probabilidad de aparición de nuevas plagas debido a una drástica disminución de la resistencia ambiental (Gürtler et al., 2005; Ribeiro-Jr et al., 2022).

Independientemente del control de los insectos, para limitar el número de infecciones, es necesaria la adopción de medidas estrictas por parte de las autoridades sanitarias al objeto de evitar la transmisión no natural, como son el caso de las transfusiones de sangre o las donaciones de órganos. En esta situación fue España el país pionero

en Europa, en implantar una legislación y normativas para controlar este tipo de contagios (Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión), normativas que han sido posteriormente aplicadas en otros países, para la realización de los controles diagnósticos necesarios cuando el donante proviene de una zona endémica o cuando el donante ha estado en países endémicos. Habitualmente se realizan en los bancos de sangre o de órganos y tejidos, al menos tres test serológicos con diferentes antígenos y metodologías según recomienda la OMS con objeto de descartar una posible infección de los donantes por *T. cruzi* (Altcheh & Freilij, 2019).

### **1.3. Vesículas extracelulares**

Todos los tipos celulares, tanto eucariotas como procariotas, liberan productos al exterior como parte de su secretoma, estos productos secretados pueden ser bien macromoléculas solubles, o bien formar parte de estructuras particuladas. En este marco se incluyen las vesículas extracelulares (EVs), estructuras vesiculares esféricas compuestas por una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos, colesterol, proteínas y glúcidos; estas vesículas transportan macromoléculas bien insertadas en la membrana o en el interior de las EVs con un contenido de proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, ADN, ARN, lípidos y metabolitos. El contenido de las EVs permite conocer la célula de origen de la vesícula extracelular como la posible célula diana a la que va a ir dirigida (Liu et al., 2022; Théry et al., 2009; van der Pol et al., 2012).

## Introducción

La primera descripción de la existencia de EVs se realizó en el año 1967, cuando se describieron una serie de factores pro-trombóticos secretados por las plaquetas y previamente caracterizados como lipoproteínas (Chargaff & West, 1946) y que se identificaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) descritas como unas pequeñas vesículas liberadas por las plaquetas, y que se denominaron como “desechos plaquetarios” (Wolf, 1967). Se describió que esta población de vesículas presentaba un tamaño entre 20 - 50 nm y una densidad entre 1,020 y 1,025 g/mL (Wolf, 1967).

Varios años más tarde, Dalton describió la presencia de numerosas vesículas de un tamaño similar en el suero bovino fetal (Dalton, 1975). En el año 1983 se describió la capacidad de los reticulocitos tanto de rata como de oveja para exportar transferrina en condiciones nativas al medio extracelular (Harding et al., 1983; B. T. Pan & Johnstone, 1983), pero no fue hasta el año 1987, cuando se asignó una función a estas EVs, ya que en ese año Johnstone describió que las EVs liberadas por reticulocitos de oveja mostraban funciones características similares a la membrana plasmática del reticulocito, incluida la presencia del receptor de transferrina, mientras que enzimas, con actividad enzimática y de localización citosólica, no eran detectables. Por lo tanto, se concluyó que la externalización de vesículas podría ser un mecanismo para la eliminación de funciones específicas de la membrana (Johnstone et al., 1987). Debido a que estas EVs contenían el receptor de transferrina, pero sin actividad lisosomal, sugirió que podía constituir un mecanismo para secretar y externalizar proteínas específicas desde la membrana plasmática de las células (Johnstone et al., 1989).

En la actualidad, sabemos que las EVs juegan un papel importante en la comunicación intercelular no mediada por contacto directo a través de los desmosomas; al ser factores nanoparticulados, presentes y resistentes en fluidos biológicos, las EVs son capaces de ejercer un papel de comunicación a nivel local o a nivel sistémico. A nivel sistémico o de modo endocrino (células distantes), de modo paracrino (células cercanas), yuxtacrino (células adyacentes) o de modo autocrino (sobre la misma célula) (Barteneva et al., 2013; de Pablos Torró et al., 2018; Yáñez-Mó et al., 2015). A pesar de que a día de hoy se ha estudiado en mayor medida el papel de las EVs en condiciones patológicas que en condiciones fisiológicas normales, sabemos que la función de las EVs dependerá de las moléculas “carga” con el que cuenta cada una, y eso dependerá a su vez de la célula de origen y de la situación del organismo.

### **Clasificación de las EVs**

Durante las primeras descripciones de las EVs el término utilizado era el de exosoma, pero hoy en día, tras numerosos estudios sobre el tamaño, densidad, biogénesis y carga de las EVs, podemos diferenciar diversas poblaciones de EVs. Pudiendo diferenciarse entre cuerpos apoptóticos, ectosomas o microvesículas y exosomas, aunque siguiendo las recomendaciones de la *International Society of Extracellular Vesicles*, emplearemos el término vesículas extracelulares o exovesículas de modo general (Witwer et al., 2021)

#### **Los cuerpos apoptóticos**

La apoptosis consiste en un proceso de muerte celular programada que puede ser inducida por varios estímulos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, este proceso ocurre tanto en



organismos multicelulares como en microorganismos como levaduras, bacterias y protozoos (Citterio et al., 2015; de Souza et al., 2003; Falcioni et al., 2008).

Los cuerpos apoptóticos, son las EVs de mayor tamaño, se les asocia a aquellas con un diámetro comprendido entre 500 - 5000 nm (Akers et al., 2013; Battistelli & Falcieri, 2020), y con una densidad entre 1,16 – 1,28 g/mL y una morfología heterogénea (van der Pol et al., 2012). La liberación de los cuerpos apoptóticos al medio extracelular se realiza mediante gemación de la membrana plasmática, la cual está regulada por diversas quinasas (PAK2, LIMK1, ROCK1, entre otras). Estas quinasas activan a Rac1 y CDC42, que inducen la remodelación del citoesqueleto, posteriormente, las enzimas Pannexin 1 y Plexin B2 serán las últimas mediadoras de la formación de estas EVs (Santavanond et al., 2021; van der Pol et al., 2012).

Para mantener la correcta homeostasis del organismo, los cuerpos apoptóticos deben ser correctamente eliminados por el sistema inmunológico, una eliminación inadecuada de los cuerpos apoptóticos se asocia con la aparición de enfermedades autoinmunes, debido al desarrollo de una respuesta inmunitaria frente a autoantígenos no expuestos normalmente al sistema inmunitario (ADN, histonas, etc.) como ocurre, por ejemplo, en la aparición del lupus eritematoso sistémico (Bilyy et al., 2012; Muñoz et al., 2010).

### **Ectosomas o microvesículas**

Los ectosomas han sido denominados también como microvesículas o micropartículas, estas EVs presentan un diámetro entre 100 - 1000 nm (Kalluri & LeBleu, 2020), pudiendo solaparse con el tamaño de los

exosomas; Pese a presentar un tamaño similar, se han descrito diversas proteínas presentes diferencialmente en los ectosomas que pueden emplearse como biomarcadores específicos, como son las metaloproteinasas, glicoproteínas (GPIb, GPIIb, P-selectina), integrinas como Mac-1 y otras proteínas descritas ATP5F1A/B, DHX9, GOT2, HSPA5, HSPD1, MDH2, STOML2 (Gasser et al., 2003; Liu et al., 2022; Mezouar et al., 2015). Al igual que los cuerpos apoptóticos, su membrana es similar a la membrana celular, ya que se forman por la gemación de la misma, cuya composición lipídica se caracteriza por un enriquecimiento en colesterol, diacilglicerol y fosfatidilserina expuesta al exterior (Théry et al., 2009). La formación de ectosomas se produce por la interacción dinámica debida a la redistribución de fosfolípidos y la contracción del citoesqueleto. Estos procesos se encuentran estrictamente regulados por translocasas de fosfolípidos, enzimas que transfieren fosfolípidos de la membrana plasmática desde una hemimembrana a la otra. Las flipasas son translocasas, que transfieren fosfolípidos de la cara externa de la membrana a la interna, mientras que las flopasas catalizan la reacción inversa. La gemación de la membrana, necesaria para la formación de estas vesículas, es inducida por la translocación de fosfatidilserina a la membrana externa. El proceso de gemación se completa mediante la contracción de las estructuras del citoesqueleto por interacciones actina-miosina (Akers et al., 2013).

Aunque los ectosomas se encuentran en prácticamente todos los fluidos biológicos, la liberación de ectosomas se ve favorecida bajo situaciones de estrés celular (Théry et al., 2009; van der Pol et al., 2012). El contenido y función de los ectosomas no está tan estudiado como en los exosomas, debido a la variabilidad de los mismos

dependiendo de la célula de origen, probablemente a causa de que las rutas de generación de los ectosomas podría mostrar una menor regulación que la ruta de biosíntesis exosomal (Kalra et al., 2016).

### Los exosomas

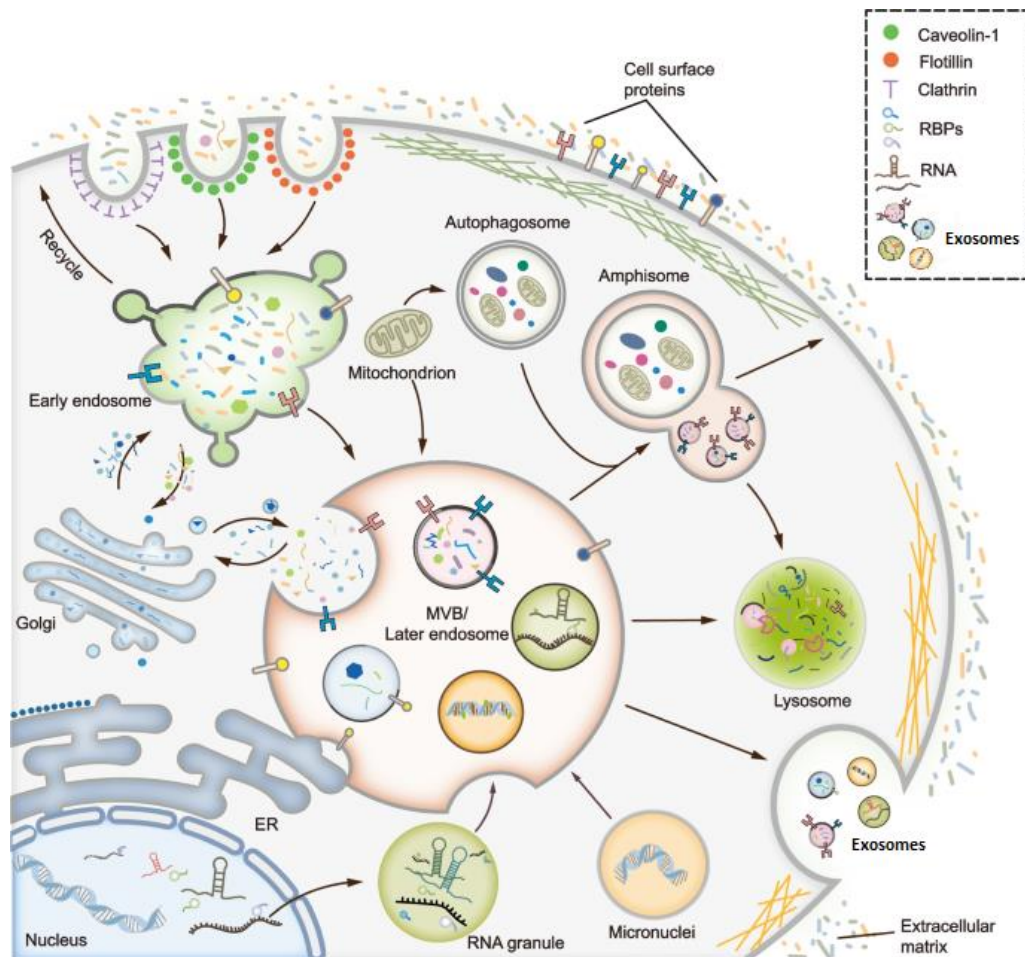
Desde su primera descripción, la comunidad científica ha profundizado en el conocimiento del campo de los exosomas, realizándose numerosos estudios sobre su contenido, biogénesis e intentando dilucidar su papel biológico, tanto en condiciones fisiológicas normales como en condiciones patológicas.

Los exosomas poseen un diámetro comprendido entre 30 y 150 nm (Kalluri & LeBleu, 2020). Se les asocia una densidad entre 1,13 a 1,19 g/mL y morfológicamente pueden asemejarse a una forma parecida a una “copa”, aunque actualmente los estudios han descrito una forma casi esférica, o como veremos en el **capítulo 3** la forma que se muestra por microscopía de fuerza atómica, los exosomas aislados de *T. cruzi*, como en forma de lágrima (Akers et al., 2013; van der Pol et al., 2012).

- **Biogénesis**

A diferencia de los otros tipos de EVs, la biogénesis de los exosomas sucede dentro de la red endosomal, las vesículas endocíticas formadas tras procesos de endocitosis se fusionan con endosomas tempranos formando un compartimento membranoso llamado endosoma tardío o cuerpos multivesiculares (MVBs) en el que se encuentran diversas vesículas intraluminales (ILs) que son dirigidas a sus destinos apropiados, incluyendo: los lisosomas para su degradación, la superficie de la membrana celular para el reciclaje de

proteínas y marcadores de membrana, produciéndose la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática, liberando las vesículas intraluminales al medio extracelular, constituyendo así los exosomas (Figura 11) (Akers et al., 2013; Q. F. Han et al., 2022; Y. Zhang et al., 2020).



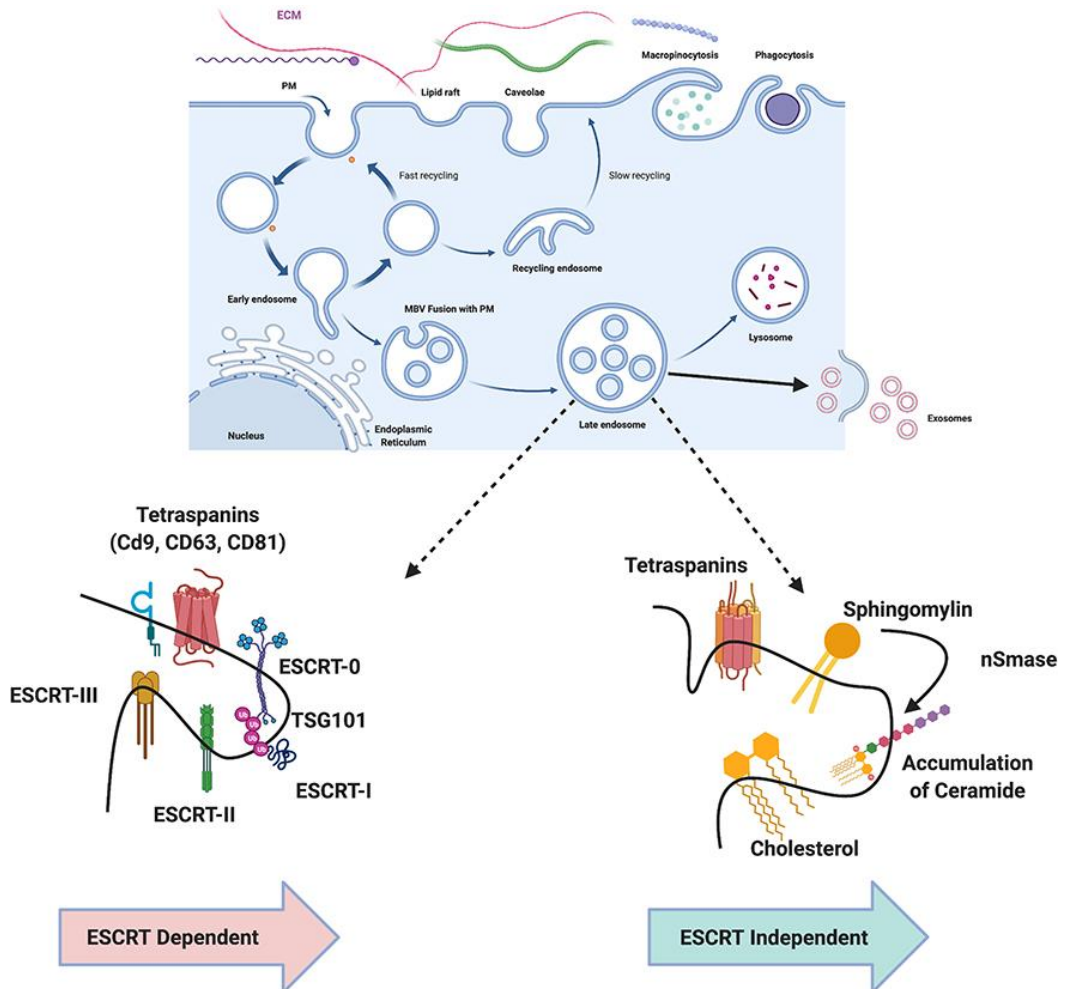
**Figura 11.** Ilustración del proceso de biosíntesis de los exosomas. Adaptado a partir de (Q. F. Han et al., 2022) con permiso de Springer Nature, Copyright 2022.

El proceso de formación de las vesículas intraluminales está altamente regulado en la célula; en dicho proceso participan numerosas proteínas que son marcadores utilizados para el

reconocimiento de los exosomas. La biogénesis puede ser dependiente o independiente del *endosomal sorting complex required for transport* o ESCRT, un conjunto de proteínas que regulan el transporte endosomal (Q. F. Han et al., 2022; Y. Zhang et al., 2020).

ESCRT consta de los subcomplejos ESCRT-0, -I, -II, -III y la ATPasa VPS4 (*vacuolar protein sorting 4*) (Hurley, 2010). ESCRT-0 está compuesto por diferentes dominios; los dominios Hrs y STAM son los que reconocen a las proteínas ubiquitinizadas, y el dominio FYVE de ESCRT-0 se une al fosfatidilinositol 3-fosfato (Akers et al., 2013). Posteriormente, se reclutan ESCRT-I y -II, que forman un complejo proteico en forma de silla de montar que facilita el ensamblaje de ESCRT-III. Tras la hidrólisis del ATP catalizada por la VPS4, las subunidades ESCRT-III favorecen la deformación y fisión de la membrana para producir finalmente vesículas intraluminales (ILVs) (Figura 12). Posteriormente, el complejo ESCRT tiene enzimas que eliminan la ubiquitina de las proteínas de las vesículas intraluminales (ILVs).

En la actualidad, se han descrito diversos mecanismos alternativos no canónicos dependientes de ESCRT como son las vías mediadas por las proteínas Alix y HD-PTP (Gurunathan et al., 2021; Q. F. Han et al., 2022; Pfitzner et al., 2020; Schöneberg et al., 2017).



**Figura 12.** Ilustración detallada del proceso de formación de vesículas intraluminales (ILVs), mostrando las proteínas relacionadas con las vías dependientes e independientes de ESCRT. Reproducido a partir de (Gurunathan et al., 2021) con permiso de Dove Medical Press, Copyright 2021.

Las vías independientes de ESCRT suelen estar mediadas por macromoléculas ancladas a las balsas lipídicas de las membranas, como pueden ser la neutral esfingomielinasa 2 (nSMase2), la caveolina-1, la flotilina-1, o las tetraspaninas junto al colesterol (Q. F. Han et al., 2022) (Figura 12).

## Introducción

La ceramida induce la formación de macrodominios de membrana que funcionan como una plataforma para atrapar otras moléculas como CD95 y CD40 (Gulbins & Kolesnick, 2003; Trajkovic et al., 2008); la enzima nSMase2 es esencial para la formación de ceramidas a partir de esfingomielina, se ha descrito que el bloqueo de la nSMase2, conlleva a una disminución de la formación de ILVs. Por su parte, la caveolina-1 es una proteína de membrana a la que une el colesterol, actuando como un andamio para el ensamblaje lipídico y proteico, además, esta proteína inicia la formación de las caveolas en la membrana plasmática mediando así la endocitosis dependiente de la caveolina (Parton et al., 2020). De manera similar, las flotilinas, especialmente la flotilina-1, son proteínas transmembrana participantes en la formación de balsas lipídicas, involucradas en una amplia gama de procesos celulares entre los que destaca el tráfico endosomal (Kwiatkowska et al., 2020).

El colesterol se encuentra enriquecido en la membrana exosomal, y su presencia está envuelta tanto en las vías dependientes de ESCRT, ya que es capaz de interactuar con el dominio Hrs presente en ESCRT-0 (Ikonen & Zhou, 2021), como en las vías independientes de ESCRT. Aunque los resultados descritos parecen ser muy dependientes del tipo celular estudiado, algunos autores describen que la presencia de colesterol en diversos tipos celulares favorece la liberación de exosomas a través de la regulación positiva de las flotilinas (Strauss et al., 2010; Z. Zhao et al., 2020), mientras que para otros autores, el colesterol induce una disminución de la liberación de las EVs en los astrocitos (Abdullah et al., 2021).

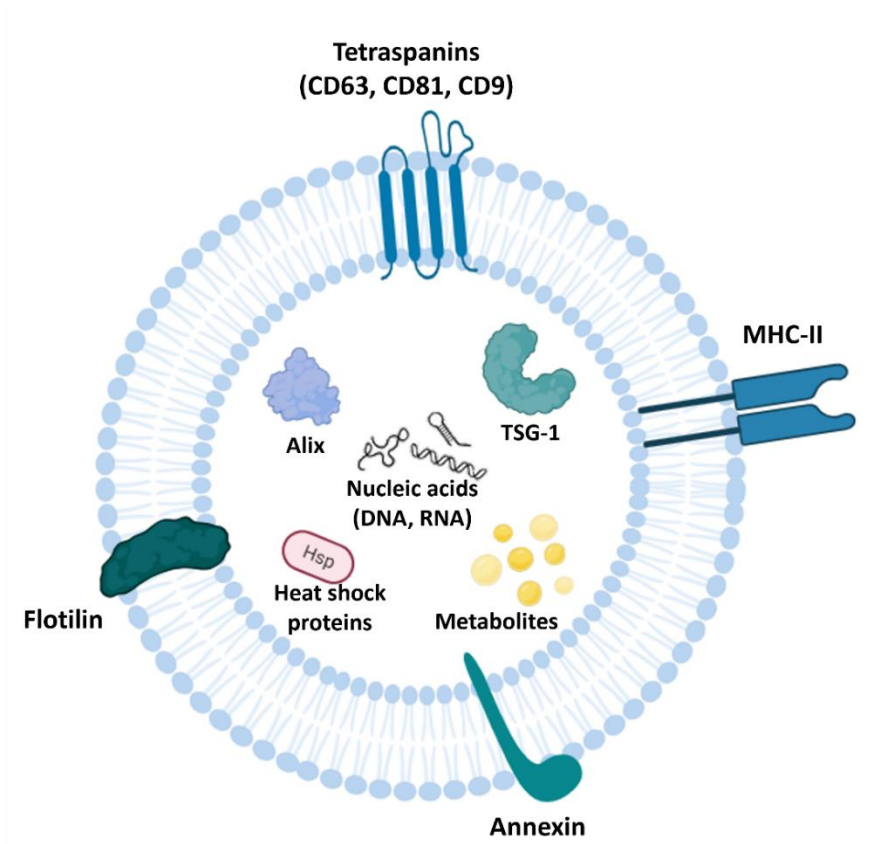
Por último, las tetraspaninas, una serie de proteínas pertenecientes a una familia de proteínas de membrana, entre las que destacan las CD63, CD81 y CD9 son capaces de translocar otras proteínas a la membrana, pudiendo de esta manera controlar la señalización celular y la transmisión de señales. En cuanto a la formación de ILVs, las tetraspaninas son capaces de modificar el cargo de las mismas, jugando un papel fundamental en la formación de los exosomas (Kummer et al., 2020; Ma et al., 2021; van Niel et al., 2011). Además de este sistema, se han propuesto numerosos mecanismos de liberación y modificación del “carga” de los exosomas, entre ellos destacamos una vía mediada por Rac y CDC42, que promueven la formación de F-actina y con ella, la formación de ILVs y la posterior liberación de los exosomas (Ekström et al., 2014; Kajimoto et al., 2013). Durante el proceso de formación de ILVs y previo a la liberación exosomal, los MVBs sufren una maduración tras la interacción con el resto de orgánulos citoplasmáticos, como es el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático, las mitocondrias o incluso los lisosomas (Kwon et al., 2016; Rabas et al., 2021). La fusión lisosomal al MVB da lugar a un anfisoma, que bien puede ser conducido hasta la degradación de las ILVs, pero también puede fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al medio extracelular (Y. G. Zhao et al., 2021). Los anfisomas son los orgánulos intermedios o híbridos producidos por la fusión de los endosomas con los autofagosomas dentro de las células. La formación de anfisomas es un paso esencial en el proceso de maduración secuencial de los autofagosomas antes de su fusión final con los lisosomas para la degradación de la carga por parte de los fagolisosomas.



La amplia variedad de procesos de formación de ILVs y posterior maduración de los mismos, hace que el contenido de los exosomas sea altamente dependiente de la célula de origen y de las condiciones fisiológicas de las mismas (Q. F. Han et al., 2022). El último paso en la biosíntesis de los exosomas será la migración de los MVBs hasta la periferia celular mediada por el citoesqueleto celular, principalmente por los filamentos de actina, que son regulados por la proteína cortactina y proteínas de la familia de las Rab, posteriormente la fusión de las membranas estará regulada por el complejo SNARE presente en el MVB que interactuará con el complejo t-SNARE presente en la membrana celular, permitiendo así la fusión de ambas membranas y posterior liberación de los exosomas (Cai et al., 2007; Sinha et al., 2016).

- **Composición de los exosomas**

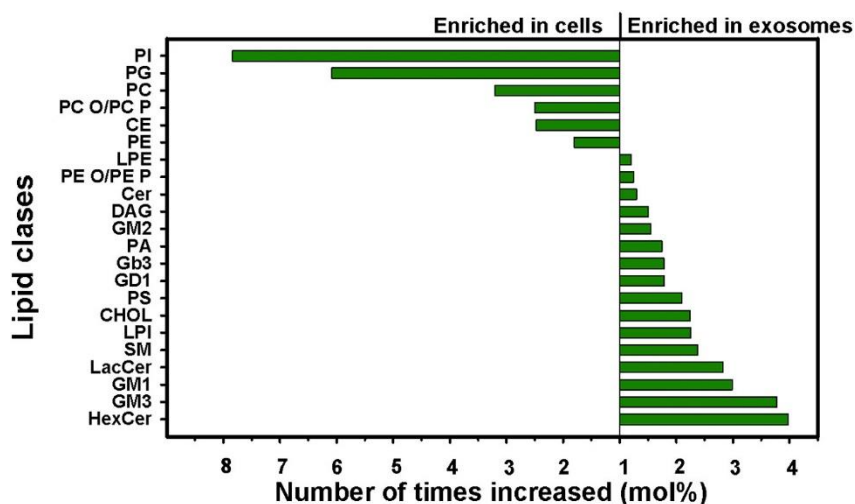
Los exosomas presentan una amplia variedad de macromoléculas en su contenido, entre las que se encuentran lípidos, proteínas (muchas de ellas enzimas que intervienen en el metabolismo celular), ADN, ARN y otros metabolitos (Figura 13).



**Figura 13.** Descripción general de algunos componentes característicos de los exosomas liberados por células de organismos mamíferos.

Resultado del proceso biosintético, los exosomas presentan una membrana lipídica con una composición similar a la membrana plasmática pero mostrando diferencias en cuanto al enriquecimiento de ciertos lípidos y fosfolípidos, en general, con una mayor proporción de ceramidas, colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélin y diacilglicérols, algunos de los cuales juegan papeles importantes en el proceso de biosíntesis y en la respuesta que desencadenan las EVs en las células diana. En la figura 14, se muestra la proporción de lípidos en las membranas de la

línea celular del adenocarcinoma de próstata (PC-3) respecto a los exosomas que liberan dichas células (Q. F. Han et al., 2022; Skotland et al., 2017, 2019; van der Pol et al., 2012).



**Figura 14.** Representación del enriquecimiento diferencial de las diversas clases de lípidos en la membrana celular y del exosoma. Reproducido a partir de (Skotland et al., 2019) con permiso de Elsevier, Copyright 2019.

Como hemos mencionado previamente, el contenido proteico de los exosomas es dependiente de la célula de origen, así como de las condiciones fisiológicas del organismo. Los exosomas portan proteínas de membrana, así como proteínas en el interior de las vesículas, las proteínas se cargarán en los exosomas durante el proceso de generación de los mismos y su posterior maduración, pudiendo ser introducidas en los exosomas desde el citosol por vías dependientes o independientes del complejo ESCRT (Q. F. Han et al., 2022). A pesar del elevado número de proteínas diferentes presente en los exosomas, determinadas proteínas pueden ser utilizadas como

marcadores de los exosomas, ya que su presencia es específica, pudiendo diferenciar así los exosomas de los otros tipos de EVs liberadas por las células (ectosomas, cuerpos apoptóticos), independientemente del tamaño y densidad de las mismas.

Los marcadores de exosomas liberados por células de mamíferos más comunes pertenecen a la familia de las tetraspaninas (CD63, CD81, CD9), si bien otras como Alix, flotilin-1, TSG101, proteínas de choque térmico, anexinas, etc (F. Deng & Miller, 2019). Las EVs liberadas por *T. cruzi*, objeto de esta tesis doctoral, carecen de los marcadores antes indicados, pero poseen proteínas conocidas específicas de los tripanosomátidos como son las MASP, las transiladasas y otras proteínas específicas de la membrana del parásito (De Pablos et al., 2016; Díaz Lozano et al., 2017).

En lo referente al contenido de ácidos nucleicos y en concreto ADN en los exosomas, se ha descrito la presencia de ADN genómico (ADNg), así como de histonas, lo que revela el origen nuclear de parte del ADN exosomal, tanto en el interior de la EV como adheridos a la superficie de las EVs (Orrego et al., 2021). De igual manera, se ha descrito ADN de origen mitocondrial (ADNmt), la proporción entre ADNg versus ADNmt ha demostrado ser diferente según el tipo de EV, estando presente ambos tipos de ADN en el interior de los exosomas, pero enriqueciéndose específicamente en la superficie de los mismos. En general, el tamaño que se ha descrito de los fragmentos de ADN presente en los exosomas ronda una longitud aproximada de unos 200 pb. La presencia de ADNg en los exosomas explicaría porqué tras el bloqueo experimental de la secreción de EVs, el ADNg se acumula en el citoplasma celular, iniciándose la

activación del estimulador de genes de interferón (STING), también conocido como proteína transmembrana 173 (TMEM173) estimuladora de genes de interferón, dando lugar a una respuesta inmunitaria innata, e induciendo la producción de interferones de tipo 1 (IFN1) e interleuquinas de la familia IL-1.

La activación de la producción de IFN-1 genera en las células un potente estado antiviral, ya que la presencia de interferones de esta clase, impide la multiplicación de los virus (Takahashi et al., 2017; Torralba et al., 2018). De esta manera la eliminación de ADN citosólico contribuye a mantener la homeostasis celular y evitar procesos de senescencia o apoptosis (Malkin & Bratman, 2020). Además, el ADN contenido en exosomas podría mediar la transferencia horizontal de genes (Horizontal gene transfer (HGT) y transcripción de dicho ADN en la célula diana, como se ha demostrado recientemente mediante el seguimiento de ADN de células madre estromales mesenquimatosas de la médula ósea y posterior secuenciación en la célula hospedadora (Thierry et al., 2016). Recientemente, se ha detectado la presencia de ADN mitocondrial (ADNmt) en el interior de los exosomas liberados por células de carcinoma mamario. Este ADN mitocondrial es capaz de activar un mecanismo dependiente de los *Toll Like Receptor 9* (TLR 9) para promover el tráfico endosomal proinvasivo en otras células y con ello una respuesta inflamatoria (Rabas et al., 2021). Nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente la presencia de ADNmt y ADNg de *T. cruzi* en los exosomas circulantes en sueros de pacientes crónicos de la enfermedad de Chagas (Lozano et al., 2023).

Las proteínas capaces de ligar ARN (RBPs, *RNA Binding Proteins*) se encuentran localizadas tanto en el núcleo celular como en el citosol, además, se ha descrito la presencia de este tipo de proteínas tanto en MVB como en ILVs y de hecho participan en la distribución de los micro ARNs en los exosomas (Groot & Lee, 2020; H. Robinson et al., 2021; Wozniak et al., 2020). Por otra parte, existen proteínas de unión a ARN, capaces de cargar ARN largos no codificantes así como ARN circular entre las proteínas de los exosomas liberados por células de glioma y células tumorales colorrectales, con importantes implicaciones de estos ARNs en la capacidad metastásica y en la tolerancia inmunogénica ejercida por dichas células tumorales (C. Chen et al., 2019, 2021, 2022; Z. Pan et al., 2022).

También ha sido descrita la presencia de ARN mensajero (ARNm) , ARN de transferencia (ARNt), micro ARN (miARN) junto a ARN ribosomal (ARNr) en el interior de los exosomas secretados por células o en los exosomas purificados a partir de fluidos corporales (Michael et al., 2010; Nolte-'t Hoen et al., 2012; Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007).

Normalmente, los exosomas purificados del suero contienen entre un 30% y un 75% de miARN, un 10-20% de ARNm y un 5-30% de ARNr, mientras que los exosomas derivados de la orina suelen poseer entre un 2 y un 10% de miARN, un 5-12% de ARNm y un 30-60% de ARNr. Otro estudio demostró que dentro del ARN exosomal secretados por dos líneas celulares mamarias (MDA-MB-231 y MDA-MB-436), el ARNr (fragmento 28S y 18S) es el más abundante (representa aproximadamente el 97%) y solo el 2% representa otros tipos de ARN

conocidos como el miARN, ARNm, etc. (Jenjaroenpun et al., 2013; M. Li et al., 2014).

- **Funcionalidad de los exosomas**

Pese a que inicialmente se consideraron un mecanismo celular para la eliminación de desechos de proteínas y otras moléculas, en la actualidad sabemos que las EVs y concretamente los exosomas desempeñan diversas funciones fundamentales en la fisiología de los organismos vivos. Como se describió en un primer momento, los exosomas constituyen una vía alternativa de secreción de proteínas, especialmente de aquellas donde en su secuencia carecen de péptido señal, pero también constituyen una vía de secreción de otras macromoléculas (Schorey & Bhatnagar, 2008). Se ha demostrado que los exosomas juegan un papel importante en la comunicación célula-célula, las células son capaces de incorporar y secretar exosomas de manera simultánea, y donde la tasa de incorporación y secreción podrá variar dependiendo del estado fisiológico de la célula receptora y secretora, lo que apoya la idea de que los exosomas pueden inducir selectivamente señales específicas de activación o depresión de rutas biosintéticas y/o metabólicas en las células receptoras para regular procesos tales como los que se observa en el desarrollo, la respuesta inmunitaria en procesos fisiológicos normales y en respuesta a enfermedades (Kalluri & LeBleu, 2020). Además, la presencia de ácidos nucleicos en los exosomas permitiría el intercambio de información genética tanto en las células eucarióticas como en procariontes, ya que estos ácidos nucleicos son biológicamente activos, pudiendo afectar la regulación postraduccional de la célula con la que interaccionan (Montecalvo et

al., 2012; Valadi et al., 2007; van der Pol et al., 2012; Yaron et al., 2000).

Los procesos de reproducción de los mamíferos y el consecuente desarrollo embrionario requieren de una comunicación intercelular dinámica. Se ha descrito la presencia de exosomas tanto en el semen como en el líquido amniótico y la leche materna. Los exosomas presentes en líquido seminal humano se han relacionado con la maduración de los espermatozoides; además, favorecen la tolerancia inmunológica existente en los genitales (Sullivan et al., 2005). Por su parte, se ha descrito que los miARNs presentes en exosomas liberados por los trofoblastos de la placenta ayudan a prevenir las infecciones virales como poliovirus, citomegalovirus, e infección por el virus del herpes simple 1 (Delorme-Axford et al., 2013).

Menon y colaboradores realizaron un análisis comparativo entre las EVs presentes en el plasma de madres que dan a luz de forma prematura revelando un total de 173 miARNs y 70 proteínas que varían significativamente respecto a las madres cuyos partos tienen lugar a las 40 semanas (Menon, Debnath, et al., 2019; Menon, Dixon, et al., 2019). Por último, las EVs presentes en la leche materna promueven el crecimiento posnatal; además, estas EVs contienen miARNs a los que se atribuyen funciones relacionadas con el sistema inmunológico, ya que la incubación *ex vivo* de estas EVs con PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) induce el aumento en del número de linfocitos Treg, promoviendo la tolerancia inmunitaria (Admyre et al., 2007; Foster et al., 2016).

Se ha estudiado también el papel que juegan los exosomas en la aparición de enfermedades cardíacas y metabólicas. Los exosomas



transfieren metabolitos que median la comunicación entre las células  $\beta$  pancreáticas, el tejido adiposo, los músculos esqueléticos y el hígado de ratones y humanos (Guay & Regazzi, 2017). Asimismo, en modelos de obesidad murinos, la señalización entre adipocitos y macrófagos está mediada por exosomas, los cuales favorecen la aparición de resistencia a la insulina. Los ratones obesos alimentados con una dieta rica en grasas muestran distintos miARN en exosomas circulantes, los cuales promueven la resistencia a la insulina en el tejido adiposo blanco en ratones (Castaño et al., 2018; Z. Deng et al., 2009). Exosomas secretados por cultivos de células humanas y murinas (células endoteliales, células progenitoras cardíacas, fibroblastos cardíacos, cardiomiocitos) se han asociado con la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes y la adaptación metabólica asociada con la insuficiencia cardíaca (Y. Zhang et al., 2017). El papel protector de los exosomas frente a la aterosclerosis ha sido demostrada en ratones, donde los exosomas derivados de plaquetas redujeron la expresión del receptor CD36 de macrófagos reduciendo la absorción de los LDL, comúnmente conocido como “colesterol malo” (Srikanthan et al., 2014).

Los exosomas pueden desempeñar un papel importante en el control o favorecimiento de la aparición de enfermedades neurodegenerativas pudiendo promover o limitar la agregación de proteínas mal plegadas ( $\beta$  amiloide) en el sistema nervioso central, ejerciendo así funciones desintoxicantes y neuroprotectoras, o participando en la expansión y agregación de estas proteínas mal plegadas, lo cual contribuye a la progresión de estas enfermedades neurodegenerativas (Budnik et al., 2016; Levy, 2017; Quek & Hill, 2017);

La propagación patológica de la agregación de las proteínas Tau (vinculadas a la unión de los microtúbulos y que a su vez se asocian a la tubulina para estabilizar el citoesqueleto de las neuronas), mediante exosomas se confirmó tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos murinos tras la inhibición de la producción de EVs, empleando un inhibidor de la esfingomielasa (GW4869), o con el ionóforo monensina, que aumenta la concentración de calcio intracelular y estimula así la producción de EVs (Asai et al., 2015; Baker et al., 2016). Pero por otro lado, también se asocia a los exosomas con funciones neuroprotectoras, pudiendo alterar la formación de oligómeros neurotóxicos expulsándolos al medio extracelular (Falker et al., 2016; Yuyama et al., 2015)

La patofisiología del cáncer ha sido asociada a diversos efectos inducidos por exosomas. Pudiendo influir tanto en la neoplasia, como en el crecimiento tumoral, la metástasis, y la resistencia a la terapia, aunque el papel que desempeñan los exosomas en la progresión tumoral, es específico del tipo y del estadio del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

La carga de los exosomas derivada de células cancerosas, constituida por ácidos nucleicos, proteínas de señalización y metabolitos, puede ejercer efectos protumorigénicos en las células estromales. Se ha demostrado que los exosomas de las células tumorales pancreáticas inician la transformación celular al inducir mutaciones en las células receptoras NIH/3T3 (Stefanius et al., 2019). Al igual que los exosomas derivados de células tumorales mamarias y de células prostáticas que inducen la neoplasia por la transferencia

de los miARNs de su carga (Abd Elmageed et al., 2014; S. A. Melo et al., 2014).

En diversos tipos de tumores se ha descrito que los exosomas liberados por células cancerosas provocan una respuesta de señalización parenquimatosa en tejidos metastásicos, siendo capaces de remodelar microambientes distantes del foco original del tumor para así facilitar la metástasis, creando lo que se conoce como nichos premetastásicos (Becker et al., 2016; Hoshino et al., 2015; Webber et al., 2010).

En cuanto al crecimiento tumoral, se ha descrito la presencia de ADNmt en exosomas de fibroblastos tumorales, los cuales inducen la fosforilación oxidativa en células tumorales mamarias, promoviendo su supervivencia y salida de la latencia metabólica en modelos murinos (Sansone et al., 2017). Además, los exosomas promueven la angiogénesis tumoral, un paso crítico en el crecimiento tumoral así como en la diseminación metastásica (Kucharzewska et al., 2013; Zhou et al., 2014). Los exosomas liberados por células tumorales pueden llevar proteínas como FasL, NKG2D, TGF- $\beta$  y PD-L1, que inducen la apoptosis de las células T, suprimiendo así la citotoxicidad mediada por células T y células NK y facilitando la supervivencia del tumor (E. Yang et al., 2020).

Por último, se ha descrito que los exosomas eliminados por las células cancerosas promueven la resistencia a diversos agentes quimioterapéuticos y de los anticuerpos. Por ejemplo, exosomas liberados por células B tumorales o por tumores de mama actúan como señuelos antigénicos para la unión de anticuerpos monoclonales terapéuticos como anti-CD20 para las células B (Aung

et al., 2011; Díaz Lozano et al., 2017), y anti-HER2 para las células de tumores mamarios (Ciravolo et al., 2012), limitando así la efectividad contra las células cancerosas. Además, los exosomas derivados de *cancer associated fibroblasts (CAF)* promueven la quimiorresistencia del cáncer colorrectal al mejorar el crecimiento de las células madre cancerosas debido a la transferencia horizontal de miARN y ARN largos no codificantes (ARNInc), reduciendo la efectividad de algunos fármacos como el Sunitinib, Paclitaxel o Gemcitabina (Au Yeung et al., 2016; Binenbaum et al., 2018; W. Chen et al., 2014; Qu et al., 2016).

Por otra parte, los exosomas pueden favorecer la presentación antigénica, favoreciendo la inducción de una respuesta inflamatoria o de una respuesta antiinflamatoria o reguladora, dependiendo del contexto del organismo o de la célula de origen (Liu et al., 2022) o si dichos exosomas van libres o van formando parte de inmunocomplejos circulantes, como se describe en el **capítulo 3** de esta tesis. Los exosomas liberados por las células presentadoras de antígeno (APC) son capaces de presentar antígenos debido no solo a la presencia de moléculas MHC-II, sino que también por la existencia de moléculas coestimuladoras, si bien la respuesta inducida es más leve que si la presentación es mediada por la célula APC directamente (Raposo et al., 1996; Raposo & Stoorvogel, 2013; Vincent-Schneider, 2002; Zitvogel et al., 1998).

A diferencia de los exosomas liberados por células dendríticas maduras, las células dendríticas inmaduras liberan exosomas que promueven la anergia/delección de las células T, así como la activación de las células T reguladoras (Treg), por lo tanto, se abre la posibilidad

## Introducción

de utilizar los exosomas como un potencial tratamiento para enfermedades autoinmunes (Bobrie et al., 2011; Yin et al., 2013). En infecciones bacterianas concretamente con *Mycobacterium tuberculosis* y *Helicobacter pylori*, los exosomas secretados por macrófagos promueven la presentación de antígenos influyendo posteriormente en la respuesta inmunitaria adaptativa (Y. Cheng & Schorey, 2013) mediante la producción de interleuquinas como IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  y facilitando la maduración de las células dendríticas y la activación de linfocitos T (CD4+ y CD8+) (Giri & Schorey, 2008; J. Wang et al., 2016).

Los exosomas secretados por bacterias pueden tener implicaciones transcurso de la infección pero en el contexto de la colonización microbiana de las mucosas humanas, desempeñando un papel importante en la tolerancia inmunológica asociada a la microbiota (Ahmadi Badi et al., 2017; Smythies & Smythies, 2014).

El ADN presente en los exosomas liberados por ciertas bacterias intracelulares como *Listeria*, *Legionella pneumophila* y *Franciscella tularensis* tienen la capacidad de activar la señalización cGAS-STING en las células cercanas, activando la respuesta inmunitaria innata (Nandakumar et al., 2019); además, los exosomas transportan componentes bacterianos desde macrófagos infectados con un patógeno intracelular como es *Mycobacterium avium* a macrófagos no infectados para activarlos mediante la activación de los *Toll Like Receptors* (TLR), induciendo una respuesta proinflamatoria en dichas células activadas (Bhatnagar & Schorey, 2007). Posiblemente, el equilibrio entre los exosomas que promueven la activación de las células T y B y los que inhiben la función de los linfocitos es un

componente importante en la patogénesis de muchas enfermedades, incluidos cánceres, enfermedades cardiovasculares y enfermedades autoinmunes (Schorey et al., 2015).

- **Potenciales aplicaciones de los exosomas**

El conocimiento sobre el papel de las EVs en las enfermedades aún está emergiendo, pero se han sentado las bases que permiten un aumento sustancial en el número de estudios que aborden la utilidad de las EVs en el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías. La presencia de diversas macromoléculas en las EVs permite una ventana de diagnóstico multicomponente para la detección y el seguimiento de enfermedades, además la capacidad de las EVs para transmitir señales intercelulares favorece su uso como potenciales vehículos terapéuticos.

#### Aplicaciones diagnósticas y terapéuticas

La presencia de las EVs en todos los fluidos biológicos de un organismo y el conocimiento de biomarcadores detectables y reconocibles en los mismos permite el uso de las EVs como biomarcadores de diversas enfermedades a través de la realización de una biopsia líquida, lo que constituiría una toma de muestra muy poco invasiva y dañina para el paciente de estudio. Como se explicó en el apartado de biogénesis de los exosomas, el proceso biosintético de los mismos permite la captura de una carga molecular extracelular e intracelular compleja para pruebas de diagnóstico multiparamétricas integrales, de manera que el conocimiento de las proteínas de superficie exosomales permite su captura con objeto de enriquecer la carga de EVs en la muestra biológica de estudio. A pesar de que son numerosas las enfermedades en las que se buscan biomarcadores

específicos para aplicación diagnóstica de los exosomas, las más estudiadas son las enfermedades cardiovasculares (Jansen & Li, 2017; Y. Zhang et al., 2017), las enfermedades neurodegenerativas (Kanninen et al., 2016) y principalmente el cáncer (Fitts et al., 2019). El potencial diagnóstico de las EVs reside tanto en la carga proteica como en la carga de ácidos nucleicos presentes en las mismas. Los miARN supresores de tumores de los exosomas se les atribuye un alto potencial diagnóstico debido a que su expresión diferencial entre las células sanas y tumorales. Entre los que destacan los miR-146a y miR-34a, se asocian con tumores de hígado, mama, colon, páncreas y leucemias (Salehi & Sharifi, 2018). Asimismo se ha descrito que la presencia de ADN de doble cadena exosomal refleja el estado mutacional de las células tumorales parentales con un enorme potencial como biomarcador en la detección temprana de cáncer y metástasis, describiéndose por ejemplo mutaciones en *KRAS* y *p53* en los tumores de páncreas (Bernard et al., 2019; Thakur et al., 2014). Igualmente, se pueden utilizar marcadores proteicos para el diagnóstico tumoral, así como para hacer un seguimiento de la remisión de la enfermedad tras la aplicación de un tratamiento, diversos grupos de investigación han descrito la utilidad de los exosomas GPC1+ o CD147+ en el diagnóstico del cáncer de páncreas, mama y colon, ya que GPC1 está enriquecido en exosomas liberados por células cancerosas, permitiendo la detección del cáncer y realizando el seguimiento de respuesta a la terapia debido a que una respuesta adecuada implicaría una disminución del número de exosomas CPG1+ (Etayash et al., 2016; Frampton et al., 2018; S. A. Melo et al., 2015; Qian et al., 2018; Yoshioka et al., 2014). Además de estas proteínas, también se han descrito la presencia de

otras proteínas en EVs liberadas por células tumorales, pudiendo tener funciones como marcadores diagnósticos y pronósticos, como por ejemplo PD-L1, MET, DEL-1, MIF, etc. (Fitts et al., 2019).

La posibilidad de combinar marcadores exosomales de diferentes naturalezas como pueden ser proteínas, lípidos, metabolitos, ADN, ARN y miARN en el diagnóstico y evaluación pronóstico de diversas patologías, permitiría mejorar la especificidad y sensibilidad de un diagnóstico basado en exosomas (Kalluri & LeBleu, 2020). Sería de gran utilidad científica y biosanitaria, expandir los conocimientos generados respecto a las capacidades diagnósticas de las EVs para enfermedades neoplásicas, en otras enfermedades, como por ejemplo las enfermedades infecciosas. En este sentido, nuestro grupo ha publicado resultados positivos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica basado en la detección y amplificación por PCR del ADNexo, obtenido a partir de EVs circulantes del suero de pacientes crónicos chagásicos, los cuales portan tanto ADNg como ADNmt del parásito, incluso cuando la parasitemia sanguínea fue indetectable (Lozano et al., 2023).

Los exosomas poseen propiedades terapéuticas de interés tanto por sí mismos como al utilizarlos como vehículos para la administración de moléculas con propiedades farmacológicas. Los exosomas tienen una eficiencia mayor que otras nanopartículas en el acceso a células, debido a que al ser estructuras del organismo, las EVs muestran una alta tolerancia al sistema inmunitario del paciente, pudiendo así ejercer la función deseada eficientemente (Fitts et al., 2019; Kalluri, 2016). Por ejemplo, se ha descrito como los exosomas secretados por células mesenquimales y epiteliales son terapéuticos por sí



mismos, y han sido empleados en el tratamiento de un paciente con rechazo contra el huésped tras un trasplante de órgano, demostrándose una mejora sin efectos secundarios sustanciales (Kordelas et al., 2014; Yeo et al., 2013). De igual manera, la administración intranasal de exosomas liberados por células madre mesenquimales humanas en un modelo murino de espectro autista, dio como resultado una mejora del fenotipo autista en los ratones tratados, aunque se desconocen los mecanismos precisos y el potencial modo de acción (Perets et al., 2018).

Existen fármacos y biomoléculas con efectos terapéuticos prometedores con baja solubilidad para los fluidos biológicos y donde están sometidos a degradación, lo que conlleva una baja biodisponibilidad; además pueden presentar efectos secundarios tóxicos debido a una baja especificidad para las células o tejidos diana. Estas dos limitaciones provocan que dichas moléculas muestren un efecto terapéutico deficiente *in vivo*. Por ello, se han desarrollado diversas estrategias de encapsulación de fármacos que funcionen como vehículos de administración sintéticos basados en ciclodextrina, polímeros catiónicos, nanopartículas poliméricas o liposomas o virus modificados con objeto de aumentar la biodisponibilidad y especificidad de las moléculas terapéuticas (Danhier et al., 2010; Tan et al., 2021).

Sin embargo, vesículas muestran una inmunogenicidad relativamente alta, provocando la degradación de estos sistemas, lo que disminuye el tiempo de circulación en el organismo, (Cataldi et al., 2017; Tsoi et al., 2016). Por el contrario, la encapsulación de fármacos en EVs posee diversas ventajas; la mayoría de EVs utilizadas en aplicaciones

terapéuticas, provienen de líneas celulares humanas o cultivos primarios y, por lo tanto, tienen nula o baja inmunogenicidad, lo que conlleva a un aumento del tiempo de circulación, y un aumento de la biodisponibilidad de las moléculas terapéuticas (Elliott & He, 2021), además pueden llevar ligandos para receptores de membrana que permitan el direccionamiento y absorción selectiva por los tejidos o las células diana, reduciendo los efectos secundarios (Yim et al., 2016). Por último, se ha descrito que las EVs son capaces de atravesar eficientemente diversas barreras biológicas, incluidos los vasos sanguíneos, la matriz extracelular e incluso la barrera hematoencefálica (BHE), lo cual constituye una característica crítica para la administración de medicamentos. A diferencia de otras nanopartículas más simples, las EVs pueden ingresar en la célula diana por diversos mecanismos, lo que aumenta la capacidad de penetración de las mismas (T. Yang et al., 2015). Además, las EVs pueden ser administradas por diferentes vías, habiéndose descrito por la vía intravenosa, por vía subcutánea, por inyección intratumoral e incluso por vía intranasal u oral (Y. Zhang et al., 2020).

A partir de los estudios de biología fundamental previamente realizados, sabemos que los ARN presentes en las EVs son capaces de alterar la expresión génica en las células receptoras. Por ello, a través de las diversas técnicas se han podido cargar exosomas artificialmente con miARN y/o con ARN de interferencia (ARNi), y analizar su potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas y neoplásicas (Kalluri & LeBleu, 2020). El hecho de que los ARN se encuentren en el interior de las EVs, le confiere protección frente a la degradación por las ribonucleasas existentes en los organismos (L. Cheng et al., 2014), a día de hoy ya se han

descrito resultados prometedores en modelos tumorales murinos con carcinoma mamario (Ohno et al., 2013), glioma (Katakowski et al., 2013), o cáncer de páncreas (Kamerkar et al., 2017; Mendt et al., 2018) entre otros.

De igual manera, existen diversas proteínas de membrana asociadas a los mecanismos de escape de la opsonización y fagocitosis que conlleva a un aumento de la vida media de las exovesículas en la circulación, entre ellas se encuentran los CD47, CD55 y CD59 (Jaiswal et al., 2009; Kamerkar et al., 2017; Y. Zhang et al., 2020). La incorporación de estos marcadores junto con otras proteínas que puedan interactuar específicamente con la célula diana, constituyen estrategias muy útiles para aumentar la biodisponibilidad hacia las zonas de interés donde dirigirlos (Fitts et al., 2019).

Por último, se han realizado ensayos utilizando los exosomas como vehículo de fármacos en patologías como el cáncer. El paclitaxel posee un papel terapéutico en una amplia variedad de tumores, es un compuesto altamente hidrofóbico, aunque presenta efectos secundarios tóxicos, por lo que su aplicación clínica es limitada. Por ello la vehiculización de este fármaco en EVs liberadas por macrófagos de tipo M1, ejerce una función terapéutica en tumores de mama, reduciendo su toxicidad y mejorando su biodisponibilidad (Agrawal et al., 2017; P. Wang et al., 2019). Otro ejemplo es el descrito por Yang et al. 2015 en el que evaluaron la eficacia de los exosomas derivados del endotelio cerebral para administrar doxorrubicina a través de la barrera hematoencefálica, observando una inhibición significativa de los tumores cerebrales en un modelo de pez cebra (T. Yang et al., 2015). Otros fármacos antitumorales

ampliamente utilizados como la porfirina (Fuhrmann et al., 2015), la tirapazamina (Lee et al., 2016), el docetaxel y el cisplatino (Y. Zhang et al., 2020) también han sido vehiculizados en los exosomas mejorando los efectos terapéuticos de la administración de dichas moléculas libres.

### Modelo de adyuvantes en vacunación de diversas patologías

La capacidad de las EVs para inducir una respuesta inmunitaria es gran interés para el desarrollo de nuevas vacunas para un espectro de enfermedades infecciosas así como de patologías como el cáncer (Gerritzen et al., 2017; Liu et al., 2022).

Las EVs bacterianas tienen propiedades que permiten su uso como adyuvantes, desde su tamaño y estructura como la presencia de múltiples patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluyendo LPS, ADN rico en CpG, peptidoglicanos y otras moléculas inmunogénicas que actúan como adyuvantes (M. Li et al., 2020). Para su uso terapéutico es necesario la modificación de las EVs con objeto de disminuir la actividad inflamatoria inespecífica del lípido A presente en los LPS bacterianos. Por ejemplo, la inmunización de ratones con EVs bacterianos conjugados a un péptido derivado del virus de la influenza A confirió protección completa frente a la infección con una dosis letal del virus de la influenza (Watkins et al., 2017). Por otro lado, desde hace más de 30 años se utiliza una vacuna frente a *N. meningitidis* que consiste en la inoculación de EVs tratadas con detergentes para así disminuir los efectos adversos de los LPS (Claassen et al., 1996; Holst et al., 2009). Actualmente se están desarrollando otras vacunas frente a bacterias como *B. pertussis*, que aunque no generan protección total frente a la infección en ratones,

evita la transmisión de la infección (Balhuizen et al., 2021). Las EVs también se han estudiado como potenciales agentes vacunales frente a virus humanos emergentes, incluidos la influenza A H1N1, MERS-CoV, Zika e incluso SARS-CoV-2 (Martins et al., 2018; Shehata et al., 2019; Wise, 2021).

Además de PAMPs, las EVs presentan antígenos asociados a tumores, así que de manera homóloga a la inducción de una respuesta protectora frente a antígenos microbianos, las EVs pueden inducir una respuesta protectora frente a células tumorales (Naseri et al., 2020; Nikfarjam et al., 2020). Por ejemplo, la inoculación de EVs liberadas por células dendríticas que sobreexpresan  $\alpha$ -fetoproteína, indujo una fuerte respuesta antígeno-específica que atenuó el crecimiento tumoral y prolongó la supervivencia en ratones con tumores hepáticos (Chiang et al., 2015).

### 1.4. Vesículas extracelulares en enfermedades parasitarias

Como se ha explicado anteriormente, el estudio de la liberación de EVs en la patofisiología de las enfermedades puede proporcionar información sobre la comunicación celular a nivel yuxtacrino, paracrino y autocrino; pero además en el marco de las enfermedades infecciosas, las EVs median la comunicación patógeno-patógeno, patógeno-célula hospedadora, y célula-célula (Barteneva et al., 2013; de Pablos Torró et al., 2018).

*Toxoplasma gondii* fue el primer parásito en el que se estudió el papel de las EVs, en 2004. Aline y colaboradores describieron que las EVs liberadas por células dendríticas estimuladas con *T. gondii* ejercían un papel protector al ser inoculadas en ratones, protegiéndolos de la infección por el parásito, y ejerciendo en los ratones una respuesta

humoral y celular antígeno específica (Aline et al., 2004). Posteriormente, se describió como los ratones pretratados con estas EVs también desarrollaron un menor número de quistes cerebrales en ratones CBA/1 infectados con *T. gondii* (Beauvillain et al., 2007, 2009).

En cuanto al papel que juegan las EVs en la patogénesis de la malaria, se ha descrito como en pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* con afectación cerebral, los niveles de EVs en suero eran mayores que en sujetos que no sufrían dicha afectación; además, tras recibir el tratamiento frente al parásito, el número de EVs en suero volvía a niveles normales (Pankoui Mfonkeu et al., 2010). Martin-Jaular y colaboradores, aislaron EVs de ratones infectados con *P. yoelii*, y describieron la presencia de proteínas del parásito en dichas EVs, y que la inyección en ratones proporcionaba protección ante una infección posterior, disminuyendo la parasitemia y aumentando la supervivencia de los ratones (Martin-Jaular et al., 2011). Por su parte, los eritrocitos infectados (*infected-red blood cells*) (iRBC), tenían una mayor producción de EVs, las cuales portan más de 30 proteínas provenientes de *Plasmodium* con propiedades proinflamatorias, siendo capaces de activar neutrófilos, aumentando su tasa de migración y estimulando la síntesis de citoquinas proinflamatorias por parte de las células mononucleares sanguíneas de sangre periférica, PBMCs (Mantel et al., 2013; Nantakomol et al., 2011). Además, las EVs secretadas por los iRBCs son capaces de inducir la gametogénesis, originando los macro y microgametocitos que permitirán la fecundación en el digestivo de los insectos transmisores de la enfermedad (Alano & Carter, 1990).

## Introducción

En *Leishmania spp.* se han realizado análisis proteómicos comparando EVs liberadas por formas procíclicas y metacíclicas de *L. infantum* y *L. mexicana*; en estos análisis se detectaron aproximadamente 50 factores de virulencia y algunas proteínas expresadas diferencialmente en cada estadio (Forrest et al., 2020; Marshall et al., 2018). Asimismo, se ha estudiado el papel de las EVs en la patogenia de la enfermedad, asociándose un papel relevante de la proteína HSP100 en la liberación de EVs de las formas promastigotes. Las EVs secretadas por los promastigotes de *L. donovani* producen una modulación del sistema inmunológico, mientras que las EVs secretadas por los parásitos donde la síntesis de HSP100 se encuentra inhibida, estimulan una respuesta proinflamatoria (Silverman et al., 2010). Probablemente la inmunosupresión generada por las EVs, sea uno de los efectos responsables de que en ratones preinoculados con EVs y posteriormente infectados tanto con *L. major* como con *L. donovani* tengan una mayor carga parasitaria que los ratones no preinoculados (Silverman et al., 2010).

En estudios proteómicos realizados en las EVs liberadas por macrófagos infectados por *Leishmania mexicana* se identificaron proteínas del parásito, de manera similar a las EVs secretadas por los iRBC infectados por *Plasmodium* ya mencionados anteriormente. En este caso, se encontraron algunos factores de virulencia como la metaloproteasa GP63, que está relacionada con la desfosforilación de la ruta IFN- $\gamma$ /Jak- STAT1, lo que conlleva a la regulación negativa de los genes proinflamatorios y la supresión de la activación de macrófagos, promoviendo la supervivencia del parásito (Hassani et

al., 2014; Hassani & Olivier, 2013; Silverman et al., 2010; Silverman & Reiner, 2012).

*Trypanosoma brucei* posee un mecanismo curioso de liberación de las EVs, forma nanotubos a partir de la bolsa del flagelo, que posteriormente se fragmentan formando así las EVs; estas vesículas contienen moléculas de la superficie del parásito, principalmente las proteínas responsables de las variaciones antigénicas y conocidas como *variant surface glycoprotein* (VSG) (Geiger et al., 2010). Las EVs liberadas por *T. brucei* pueden transferir factores de virulencia entre unos clones y otros, como es el factor a la resistencia del suero (SRA) (Szempruch et al., 2016). En cuanto al papel en la interacción parásito-hospedador, tanto las VSG como el ADN del parásito, y a las islas CpG, presentes en las EVs, interactúan con los diferentes TLRs y en especial el TLR9, induciendo una fuerte respuesta inmunitaria mediada por macrófagos y células dendríticas, con un aumento de la expresión de mediadores proinflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 y iNOS) así como un aumento de la expresión de las moléculas presentadoras de antígenos (MHC-I y MHC-II) (Stijlemans et al., 2016).

En la misma línea, la interacción de PBMCs con estas EVs, provoca el aumento de la proporción de las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, junto con los linfocitos T reguladores (FoxP3+) (Dias-Guerreiro et al., 2021). Por último, se ha propuesto que las EVs de *T. brucei* contienen proteínas y *ARN spliced leader* capaces de aumentar la motilidad de los parásitos y de inducir modificaciones en el endotelio vascular, aumentando la permeabilidad, y favoreciendo la invasión del sistema nervioso central y los ganglios linfáticos y con ello la



diseminación del parásito y el acceso a órganos inmunológicamente protegidos (Varikuti et al., 2020)

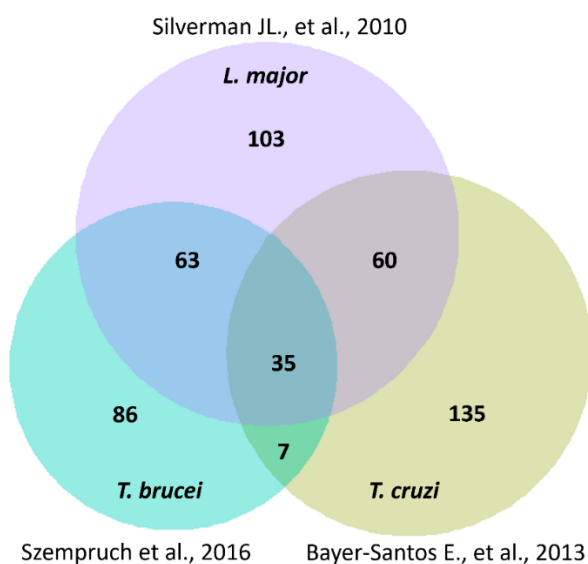
Da Silveira y colaboradores fueron los primeros en demostrar la secreción de EVs por parte de las formas epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi*. Dichas EVs fueron concentradas por ultracentrifugación y observadas mediante TEM por lo que se dedujo que su origen derivaba de la membrana plasmática y de la bolsa del flagelo (Da Silveira et al., 1979).

Estudios posteriores consideraron a las EVs como factores de virulencia, describiendo que la preinoculación de ratones Balb/c con las EVs liberadas por los tripomastigotes 7 días antes de la infección de los ratones, produjo un aumento en la carga parasitaria en los nidos de amastigotes cardiacos y en la mortalidad respecto al grupo de ratones control (Trocoli Torrecilhas et al., 2009).

Con objeto de conocer las diferentes proteínas presentes en las EVs, se han realizado estudios proteómicos en las EVs de diferentes cepas de *T. cruzi*, analizando las diferencias entre las cepas YuYu e Y, y entre las formas tripomastigotes y epimastigotes de la cepa DM28c (Bayer-Santos et al., 2013; Ribeiro et al., 2018); de ambos estudios se extrae que la carga proteica es dependiente de la cepa de estudio y del estadio del parásito, en todos los análisis se describe la presencia de factores de virulencia, como son las transialidasas (TcTS), GP85, las Mucine Associated Surface Proteins (MASP), la GP63, cruzipaína, glicoproteínas  $\alpha$ -galactosiladas, etc., aunque en diferentes proporciones dependiendo de la cepa y UDT utilizada en los estudios. Muchas de estas proteínas se asocian con los procesos de adhesión e invasión celular, así como en mecanismos

inmunomoduladores (Bayer-Santos et al., 2013; Ribeiro et al., 2018; Trocoli Torrecilhas et al., 2012).

Comparando los proteomas de las EVs liberadas por *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani*, se encontraron solo 35 proteínas comunes, las cuales se incluyen entre las 100 proteínas que se encuentran con mayor frecuencia en las EVs liberadas por células de mamíferos (D. Choi et al., 2013).



**Figura 15.** Diagrama de Venn que compara los estudios proteómicos realizados en EVs liberadas por formas epimastigotes de *T. cruzi* (n = 237) (Bayer-Santos et al., 2013), promastigotes de *L. major* (n = 261) (Silverman et al., 2010) y *T. brucei* (n = 191) (Szempruch et al., 2016).

Las glicoproteínas TS/gp85, MASP y mucinas presentes en EVs están asociadas a la membrana plasmática y ancladas por medio del glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas glicoproteínas constituyen algunos de los principales antígenos expresados en la membrana plasmática.

## Introducción

Las glicoproteínas ancladas a GPI protegen a los parásitos frente a la activación del sistema inmunitario, siendo capaces de modular la respuesta del hospedador mediante diversos mecanismos, entre los que destacan la presencia de un ancho glicocáliz que dificulta la citotoxicidad mediada por anticuerpos, la inhibición de la activación del complemento, la inducción de la anergia de linfocitos, etc. (Almeida & Gazzinelli, 2001; Marcilla et al., 2014). En 2017 nuestro grupo describió como las EVs liberadas por las formas tripomastigotes de *T. cruzi*, tenían la capacidad de inhibir la lisis de los epimastigotes mediada por el complemento (Díaz Lozano et al., 2017).

En esta misma línea, la capacidad de las moléculas presentes en las EVs con capacidad de interactuar con las células del hospedador fue descrita por Cestari y colaboradores en 2012, en un trabajo en el que se describe como la estimulación de una línea celular de monocitos con tripomastigotes metacíclicos o tripomastigotes derivados de cultivos celulares induce la secreción de EVs celulares, mientras que la estimulación con epimastigotes no lo induce. En nuestra opinión, quizás como consecuencia de que las formas epimastigotes carecen de los mecanismos de invasión celular. La capacidad para inducir la liberación de EVs derivadas de la célula hospedadora, podría constituir un mecanismo de evasión inmunitaria, ya que, al igual que las EVs liberadas por el parásito, son capaces de evitar la activación del sistema del complemento lo que, da como resultado una mayor infectividad y supervivencia del parásito (Cestari et al., 2012; Wyllie & Ramirez, 2017).

Son pocos los estudios que analizan la carga de lípidos y ácidos nucleicos en las EVs de *T. cruzi*. Respecto a la presencia de los fosfolípidos se sabe que portan cardiolipina, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina; Mientras que los ácidos grasos, los más abundantes son el 5-octadeceno, 1-octadeceno, 1-hexadeceno y 3-heptadeceno (Torrecilhas et al., 2020).

En lo concerniente a ácidos nucleicos, García Silva y colaboradores publicaron la presencia de ARN de transferencia y ribosomal en las EVs liberadas por formas epimastigotes; estos ARNs son capaces de incorporarse en las células hospedadoras pudiendo intervenir en el metabolismo celular (Garcia-Silva, Cura das Neves, et al., 2014).

La presencia de moléculas inmunogénicas en las EVs provoca que haya un reconocimiento antigénico por parte de los anticuerpos del hospedador infectado que reconocen y se unen a los epítomos de los antígenos parasitarios presentes en las EVs, compitiendo con el reconocimiento del propio parásito, y reduciendo así la efectividad de la respuesta antiparasitaria mediada por los anticuerpos. Durante las primeras etapas de la infección, el reconocimiento antigénico del parásito está mediado principalmente por las IgMs, y no será hasta aproximadamente la tercera semana post infección, cuando aumentan los niveles de IgGs. En infecciones por *T. cruzi* la subclase mayoritaria es la IgG2a (Bermejo et al., 2011) aunque posteriormente nuestro grupo demostró que ratones inoculados con *T. cruzi* mantienen un título alto de IgMs hasta 20 semanas después de la inoculación (De Pablos et al., 2016).

La presencia de inmunocomplejos (ICs) en personas con enfermedad de Chagas ha sido descrita por algunos autores tanto en pacientes como de forma experimental en animales (Chaves et al., 1979, 1982), atribuyéndoseles a dichos inmunocomplejos algunas de las manifestaciones patológicas de la fase crónica de la enfermedad (Corral et al., 1987; Costa et al., 1991; Mosca & Cedillos, 1988). Estos autores propusieron la utilización de dichos inmunocomplejos como herramientas útiles para el diagnóstico de la enfermedad (Petray et al., 1992). El análisis proteómico de dichos inmunocomplejos fue llevado a cabo por Ohyama K y colaboradores en el año 2016, los cuales realizaron un análisis proteómico de los antígenos del parásito presentes en dichos IC del suero de los pacientes crónicos afectados por la enfermedad de Chagas. Describiendo en los ICs, la presencia de proteínas de tripanosomátidos, como son las TcTS o la GP63 (Ohyama et al., 2016).

Durante la fase aguda de la enfermedad, en el suero de estos pacientes, la mayoría de EVs circulantes se encontrarían mayoritariamente libres o bien formando ICs con las IgM. Mientras que es en la fase crónica cuando se podrán encontrar los antígenos de las EVs ligadas a las IgGs, formando inmunocomplejos (EVs-IgG) cuya presencia en los sueros de pacientes de la enfermedad de Chagas crónicos, fue descrita por nuestro grupo en 2017 (Díaz Lozano et al., 2017). Estos datos nos han permitido abordar en el **capítulo 3** el potencial efecto de la región constante (Fc) de las inmunoglobulinas, así como de la sialización de las IgG formadoras de inmunocomplejos en la capacidad de inmunomodulación de las poblaciones de macrófagos peritoneales capaces de ligar las Fc de las IgGs y que contribuyen a las funciones protectoras del sistema

inmunológico. El reconocimiento de las EVs por las IgG (opsonización) permitiría a los inmunocomplejos ser reconocidos por los receptores Fc (FcγR), los cuales están presentes en diversos tipos celulares (entre otros, linfocitos B, células dendríticas foliculares, células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos y plaquetas), incluidas otras células con un similar origen embriológico que las células del sistema inmunitario (Junker et al., 2020; Krylova & Feng, 2023). Además, como discutiremos en profundidad en el capítulo correspondiente, las diferencias en el patrón de glicosilación de las IgG y en concreto de sialización, conlleva a una afinidad diferencial respecto a los diversos tipos de receptores de membrana FcγR, y a los que se les asocia la inducción de respuestas inflamatorias o reguladoras (Kaneko et al., 2006).



## **2. Objetivos**





### **Objetivo general:**

El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar las diferencias del “carga proteico” y las modificaciones a nivel transcriptómico e inmunológico que inducen las vesículas extracelulares liberadas por formas infectantes de *T. cruzi*. A fin de poder correlacionar dichas alteraciones con algunas de las manifestaciones patofisiológicas que se manifiestan en la enfermedad de Chagas.

### **Objetivos específicos:**

1. Realizar un estudio comparativo de las propiedades físicas y del proteoma de las vesículas extracelulares liberadas por las formas infectantes (tripomastigotes) y no infectantes (epimastigotes) de la cepa Pan4 de *T. cruzi* (UDT I).
2. Analizar las posibles modificaciones en el transcriptoma de las células no infectadas de una línea celular de riñón de mono verde africano (Vero) tras la interacción con las EVs liberadas por formas tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*
3. Caracterizar el papel que juegan tanto las EVs libres, como aquellas que forman inmunocomplejos con IgGs específicas frente a *T. cruzi* en las poblaciones de macrófagos peritoneales, analizando el perfil de respuesta inmunitaria inducida en las subpoblaciones de macrófagos en función de su expresión de interleuquinas. Estudiar el posible papel de la sialización de las IgGs que forman los inmunocomplejos en la modulación de la respuesta inmunitaria inducida.



# 3. Metodología



### 3.1. Cultivos celulares

Para llevar a cabo esta tesis doctoral ha sido necesario la realización de cultivos celulares con objeto de obtener formas tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* derivadas de cultivos celulares infectados y realizar los experimentos correspondientes al **capítulo 2**.

La línea celular utilizada ha sido la línea celular Vero (ATCCCL-81), una línea de células epiteliales procedente de riñón de mono verde africano, proporcionada por el banco de líneas celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR).

#### **Cultivo de células Vero**

El cultivo celular se llevó a cabo en frascos Nunc de 75 cm<sup>2</sup> de superficie (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU), las células se cultivaron en una estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda enriquecida con el 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo utilizado para la línea celular Vero fue el medio MEM (*Minimum Essential Medium*), compuesto por 9.53 g/L MEM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), 2.2 g/L carbonato de sodio, 4.4 g/L HEPES, pH 7.2) suplementado con 10% de suero bovino fetal previamente inactivado tras el tratamiento mediante calor a 56°C durante 30 minutos (SBFi) (Gibco, Nueva York, NY, EEUU). El medio se suplementó con antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL).

Para realizar los subcultivos de esta línea celular, una vez el cultivo había alcanzado la confluencia o monocapa sobre la superficie del frasco de cultivo, se eliminó el medio de cultivo, y se realizaron tres

lavados con PBS estéril, con objeto de retirar entre otros. los iones divalentes del medio de cultivo, que son necesarios para mantener las uniones celulares. Posteriormente, se agregó 1 mL de una solución de tripsina 0.05%, y 0.85 mM EDTA.

Los frascos se incubaron 10 minutos a 37°C, con el fin de disociar las uniones célula-célula y célula-frasco de cultivo. Posteriormente, se agregaron 5 mL de medio MEM + 10% SFBi para inactivar la tripsina con los iones calcio y magnesio, así como mediante los inhibidores de tripsina presentes en el suero. La suspensión celular se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos y el botón celular resultante se resuspendió en medio de cultivo fresco y las células se sembraron en nuevos frascos de cultivo.

### **Cultivo de parásitos**

Durante la realización de esta tesis doctoral se ha utilizado la cepa Pan4 de *Trypanosoma cruzi* (Tcla + Tcld) (Cura et al., 2010), una cepa aislada en 2004 de un paciente de la comunidad de Burunga (Panamá) y donada a nuestro laboratorio por la Dra. Argentina Ying de la Universidad de Panamá.

### **Cultivo de epimastigotes y metaciclologénesis *in vitro***

Las formas epimastigotes multiplicativas, se cultivaron en medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*, 4 g/L NaCl, 0,4 g/L KCl, 15 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g/L glucosa, 3 g/L infusión de hígado, 5 g/L triptona, 2 g/L hemina) + 10% SBFi en una estufa de cultivo a 28°C. Los parásitos se mantuvieron en fase exponencial de la curva de crecimiento subcultivándolos cada 4 días.

La inducción de la diferenciación *in vitro* de las formas epimastigotes no infectivos a tripomastigotes metacíclicos infectivos se realizó llevando a cabo la metodología descrita por Osuna y colaboradores (Osuna et al., 1990). Brevemente, partiendo de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial de crecimiento, el cual se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos. El botón de parásitos se resuspendió en medio TAU (*Triatomine Artificial Urine*, 190 mM NaCl, 8 mM de tampón fosfato, 17 mM de KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH: 6), ajustándose la concentración a 5x10<sup>8</sup> parásitos/mL, los parásitos se incubaron durante 2 horas a 28°C. Posteriormente, se centrifugaron a 2000 xg durante 5 minutos a 28°C. El botón de parásitos fue resuspendido con el medio TAU suplementado con aminoácidos (TAU3AAG, medio TAU suplementado con 10 mM de L-prolina, 50 mM de L-glutamato de sodio, 2 mM de L-aspartato de sodio y 10 mM de D-glucosa), ajustando la suspensión de parásitos a una concentración de 5x10<sup>6</sup> parásitos/mL que se incubaron durante 72 horas a 28°C. Los parásitos fueron observados diariamente, hasta que la tasa de diferenciación fue de aproximadamente un 70%. La suspensión de tripomastigotes metacíclicos se centrifugó 1000 xg durante 5 minutos, el botón con los tripomastigotes metacíclicos se resuspendió en 1 mL de medio MEM sin SFBi, para llevar a cabo la infección de las células Vero. El tiempo que se mantuvo la suspensión de las formas infectantes con las células fue de aproximadamente 4 horas, transcurrido lo cual se lavaron con medio MEM 10% SBFi a fin de eliminar las formas del parásito que no hubieran entrado.



## **Cultivo de formas tripomastigotes derivadas de cultivo celular**

Las formas tripomastigotes de *T. cruzi* se obtuvieron a partir de cultivos celulares de células Vero. Para ello, cuando los cultivos celulares alcanzaron el 80% de confluencia, se les retiró el medio de cultivo, y las células se incubaron con  $10^6$  tripomastigotes metacíclicos resuspendidos en medio MEM, durante 4 horas. Una vez transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante con los parásitos que no habían invadido las células.

Los cultivos de células infectadas se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, aproximadamente a las 96-120 horas después de la infección se comenzó a observar formas de tripomastigotes en el sobrenadante del medio de cultivo celular. A partir de ese momento, el sobrenadante con tripomastigotes se recolectó todos los días añadiendo posteriormente al cultivo de las células infectadas, medio de cultivo fresco durante quince días, con el fin de obtener los parásitos para realizar el aislamiento y purificación de EVs diariamente.

### **3.2. Obtención y purificación de EVs liberadas por formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Cuantificación de las proteínas presentes en las EVs**

La purificación de EVs se llevó a cabo utilizando la metodología previamente descrita por nuestro grupo (Díaz Lozano et al., 2017; Retana Moreira et al., 2019). Para la obtención de EVs liberadas por tripomastigotes, los tripomastigotes presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares infectados se purificaron por centrifugación. En primer lugar, el sobrenadante se centrifugó a 500 xg con objeto de eliminar los detritos celulares y los *amastigotes-like* extracelulares, el

sobrenadante se centrifugó a 1000 xg durante 5 minutos; el pellet con los tripomastigotes se lavó tres veces con PBS estéril. Una vez lavado, los tripomastigotes se resuspendieron en 10 mL de medio MEM sin SBFi, pH 7,2, manteniéndolos en la estufa de cultivo a 37°C durante 4 horas. Durante este tiempo los parásitos liberaron EVs al medio extracelular. Transcurrido este tiempo, la suspensión de parásitos y EVs se centrifugó a 1000 xg durante 15 minutos a 4°C, eliminando el pellet de parásitos.

El sobrenadante obtenido del medio de liberación de las EVs se centrifugó a 17000 xg durante 30 minutos a 4°C, al objeto de separar las EVs de mayor tamaño entre los que se encuentran los cuerpos apoptóticos y los ectosomas, que quedan en el botón, mientras que los exosomas permanecen en el sobrenadante. Al objeto de eliminar las posibles EVs de mayor tamaño, el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de 0,22 µm (Sartorius, Alemania), y el filtrado fue ultra centrifugado a 100000 xg durante 4 horas a 4°C, utilizando el rotor de ángulo fijo P70AT, en una ultracentrífuga CP100NX (Hitachi Koki, Tokio, Japón). El pellet de EVs fue lavado tres veces con PBS estéril filtrado por 0,22 µm.

### **Cuantificación de proteínas con *Micro BCA™ Protein assay kit***

Las proteínas presentes en la muestra de EVs se cuantificaron utilizando el kit Micro BCA™ Protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU).

El uso de este kit permite la detección colorimétrica de las proteínas, debido a que el ácido bicinconínico (BCA) forma un producto que muestra un máximo de absorbancia a 562 nm tras una reacción de quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), que

es reducido desde  $\text{Cu}^{+2}$  por la cisteína, triptófano, o tirosina, y los enlaces peptídicos presentes en las proteínas, por lo que la cantidad de  $\text{Cu}^{+1}$ , y por tanto, de señal colorimétrica, será proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra a cuantificar. El cromógeno, tiene su máximo de absorbancia a 562nm, por lo que la medida se realizó a esta longitud de onda en un lector de placas Multiskan® Spectrum (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU) (Wiechelman et al., 1988).

Para llevar a cabo la cuantificación, en nuestro laboratorio se ha modificado el protocolo proporcionado por el fabricante, con objeto de reducir el uso de reactivos y de muestra. Para ello, se preparó una curva patrón con las siguientes concentraciones de albúmina: 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1 y 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , diluidos en una mezcla de las disoluciones comerciales A, B y C en una proporción 25:24:1 respectivamente. De la misma manera, la muestra se diluyó en esta mezcla, se incubó a 60°C durante 30 minutos, y finalmente se realizó la medida de absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de placas. Los valores de la curva patrón seguían una recta de regresión. Una vez calculada el valor de la  $r$  los valores de absorbancia de las muestras problema fueron extrapoladas conociéndose así las concentraciones proteicas de las muestras empleadas en los experimentos.

### **Análisis del tamaño y pureza de las EVs purificadas**

La evaluación de la pureza de las EVs que habían sido purificadas se llevó a cabo a través de diferentes técnicas como *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), *Dynamic Light Scattering* (DLS) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

### ***Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)***

Mediante esta técnica se puede hacer un seguimiento de la trayectoria que siguen las nanopartículas presentes en una suspensión coloidal en una cámara cerrada, por lo que el movimiento detectado es únicamente debido al movimiento browniano de las nanopartículas. El equipo sigue la trayectoria de todas las nanopartículas presentes en la suspensión durante un tiempo determinado, basándose en la trayectoria que sigue cada nanopartícula en dicho periodo de tiempo, el equipo es capaz de extrapolar el diámetro hidrodinámico de todas nanopartículas presentes en la muestra, dando un resultado de la distribución de tamaños de las partículas presentes en la muestra (Dragovic et al., 2011). Esta técnica nos aporta información de un gran número de nanopartículas, por lo que el poder estadístico es muy robusto, pero no genera imágenes que proporcionen información sobre la forma de las partículas (Théry et al., 2018).

Para la realización de la medida se hicieron diluciones sucesivas 1:10 hasta encontrar la dilución óptima que permitiera un correcto enfoque de la muestra, con un número suficiente de trayectorias seguidas, para que el resultado fuese significativo (con más de 500 trayectorias se puede considerar significativas). Las medidas se realizaron utilizando un instrumento equipado con un láser de 405 nm de alta sensibilidad, con una cámara complementaria metal-óxido-semiconductora. Se tomaron y analizaron tres vídeos de 60 segundos, el análisis se llevó a cabo con *NTA 2.3 image-analysis software* (NanoSight Ltd., Amesbury, UK). Las condiciones de obturador, ganancia, brillo y umbral fueron ajustadas manualmente

durante la medida, que fue realizada a 25 °C. La distribución de tamaño medio se calculó como la media de tres distribuciones de tamaño independientes.

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

Esta técnica se fundamenta en la dispersión de luz de las nanopartículas en suspensión, un haz de luz láser pasa por una cubeta en la que se encuentra la suspensión coloidal, perpendicular al haz utilizado se encuentra un detector sensible a la luz dispersada por las nanopartículas. La dispersión de la luz presentará fluctuaciones debido al movimiento browniano de las partículas, el cual dependerá del tamaño de las nanopartículas y de esta manera se puede calcular el rango hidrodinámico de la suspensión de nanopartículas.

Al igual que el NTA, el DLS consiste en una técnica que proporciona información de un gran número de partículas, pero tiene más limitaciones que el NTA, ya que no permite la cuantificación de nanopartículas y los resultados obtenidos son específicos para suspensiones coloidales monodispersas, pero menos específicos para las suspensiones coloidales no monodispersas (Dwivedi et al., 2022). Para realizar las medidas se realizaron diluciones sucesivas 1:10 en PBS filtrado por 0.22 y se utilizó un equipo Zetasizer Nano range system (Malvern Instruments, RU).

### **Microscopía electrónica de transmisión**

Con objeto de visualizar y evaluar la pureza de las EVs purificadas se llevó a cabo la observación de las EVs utilizando microscopía electrónica de transmisión.

Para ello, sobre una superficie hidrófoba fue colocada una suspensión de EVs de conteniendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  EVs. La rejilla de níquel cubierta con una película de carbón se dispuso sobre la gota de la suspensión de las EVs que se incubó durante 5 minutos con objeto de favorecer la adsorción de las EVs a la rejilla, posteriormente la rejilla fue lavada con PBS filtrado por  $0.1 \mu\text{m}$  durante 1 minuto. La preparación se contrastó colocando la rejilla sobre una gota de acetato de uranilo al 1% en solución acuosa durante un minuto. Transcurrido este tiempo se eliminó el acetato de uranilo y la rejilla se secó sobre un papel de filtro. Las EVs se fijaron posteriormente con vapores de glutaraldehído, incubándose durante una hora a temperatura ambiente. La observación de la muestra se realizó utilizando el microscopio electrónico LIBRA 120 PLUS (Zeiss, Jena, Alemania) en la unidad de microscopía electrónica del Centro de Instrumentación Científica, en la Universidad de Granada.

### **Microscopía de fuerza atómica**

La microscopía de fuerza atómica es una técnica fundamentada en el escaneo de diferentes muestras por parte de una punta situada en el extremo de un cantiléver, una estructura capaz de subir y bajar en el eje Z, con objeto de realizar un escaneo topográfico en los ejes X e Y de la muestra a analizar, obteniendo imágenes con una resolución menor de 1 nm y una amplificación de 6 órdenes de magnitud. Además, la microscopía de fuerza atómica es capaz de proporcionar datos sobre las propiedades biomecánicas de la muestra a analizar, como son la elasticidad y la adhesividad de la muestra (Parisse et al., 2017). La preparación de las muestras para su análisis bajo el microscopio consiste en la colocación de 10  $\mu\text{L}$  de muestra (20  $\mu\text{g}$  de

proteínas, lo cual corresponde a aproximadamente  $3 \times 10^8$  EVs) sobre láminas de mica moscovita para favorecer su adsorción. Tras la adsorción de la muestra durante 10 minutos, se realizaron 3 lavados a la mica con agua destilada y se dejó secar al aire durante 10 minutos. Para la visualización se utilizó un microscopio Park AFM NX20 (Park Systems, Korea), en la unidad de microscopía de fuerza atómica del Centro de Instrumentación Científica, en la Universidad de Granada.

### **3.3. Obtención de un inmunisero anti-*T. cruzi***

Para la obtención del inmunisero se inocularon 4 ratones hembra, de seis semanas de edad con un lisado de formas tripomastigotes de *T. cruzi* obtenidas de cultivos celulares. Para ello, se purificaron los parásitos presentes en los sobrenadantes de cultivos de células Vero como se ha explicado previamente. Los parásitos se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación lenta y a un proceso de sonicación con objeto de llevar a cabo un extracto de dichos parásitos. Posteriormente se procedió a la precipitación de proteínas, mediante el tratamiento durante 12 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  con 5 volúmenes de acetona. Trascurrido el tiempo de precipitación, la muestra fue centrifugada a  $15000 \text{ xg}$  durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para concentrar las proteínas precipitadas y eliminar la acetona, los restos de acetona fueron eliminados por evaporación haciendo pasar una corriente de nitrógeno hasta la total eliminación del disolvente.

El botón de proteínas precipitadas, se resuspendió en PBS y se cuantificó utilizando el Micro BCA™ Protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU) como previamente se ha descrito.

Previo a la inoculación se extrajo sangre de la vena femoral a fin de obtener una muestra de suero preinmunización. El proceso de inmunización se llevó a cabo a través de seis inoculaciones de 25 µg de proteínas del lisado de tripomastigotes a cada ratón. La inoculación se produjo cada siete días, inyectando una emulsión con el adyuvante de Freund como se describe a continuación. La primera inoculación se llevó a cabo tras hacer una emulsión líquido-líquido (1:1) entre la solución conteniendo las proteínas del lisado de parásitos y el adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). El resto de las las inoculaciones sucesivas se realizaron preparando la emulsión de igual manera, pero utilizando el adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

La sangre obtenida se introdujo en tubos BD Microtainer, centrifugándose a fin de obtener la separación de las células sanguíneas y obteniendo el suero del animal en la parte superior del gel separador. A lo largo de las inoculaciones la extracción de sangre se repitió y siete días después de la última inoculación. Se sacrificó el animal por punción cardiaca a fin de obtener el suero y conocer el título de dicho inmunisero, para lo que se realizó una ELISA.

Para ello, se sensibilizó una placa de ELISA con 5 µg del antígeno inoculado por pocillo, diluido en tampón carbonato pH 9,4. La placa se sensibilizó durante toda la noche a 4°C, posteriormente, se realizaron 4 lavados con la solución de lavado (PBS-0,1% Tween 20) y se procedió al bloqueo de los pocillos para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, incubando la placa de ELISA con la solución de bloqueo (solución de lavado + 5% leche en polvo). Una



## Metodología

vez bloqueada la placa y tras realizar cuatro lavados, se incubó con diluciones seriadas de los sueros de los animales inmunizados, desde 1:100 hasta 1:12800, la incubación se llevó a cabo durante 90 minutos en agitación, a temperatura ambiente. Tras lo que se realizaron 4 lavados y se incubó con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con peroxidasa (Agilent, Saint Claire, CA, EEUU), a una dilución 1:2000; la incubación se realizó durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación. Tras eliminar el anticuerpo secundario no ligado, mediante cuatro lavados con PBST, se procedió al revelado de la ELISA; para ello, se añadió la solución de sustrato de peroxidasa a los pocillos—compuesta por 12,5 mL tampón citrato (0,1 M ácido cítrico, 0,1 M citrato de sodio, pH 5), 12,5 mL agua destilada, 10 mg de OPD (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y 25  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno del 30%. La placa se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos, tras los cuales se adicionó 50  $\mu$ L de la solución de parada (3M HCl) con objeto de detener la reacción. La lectura se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 492 nm, en un lector de placas MultiSkan Spectrum kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU). Como control negativo se utilizó un suero de los animales obtenido previo a la inmunización. El título del suero obtenido fue la última dilución a la cual la absorbancia del inmunisero superó al valor de corte, el cual corresponde al valor de la media de las absorbancias del suero más 3 veces el valor de la desviación estándar obtenida con dichos sueros control ( $\bar{X} + 3 \text{ SD}$ ).

## **Purificación de inmunoglobulinas del suero de los animales inmunizados**

La purificación de las inmunoglobulinas G (IgG) empleadas en los experimentos se realizó por dos metodologías diferentes.

### **Purificación con columna de proteína G**

En primer lugar, se utilizó una columna de proteína G, (Protein G HP SpinTrap, Cytiva, Washington, D.C., EEUU). La proteína G es una proteína de origen bacteriano, presente en la pared de las bacterias del género *Streptococcus*, capaz de unir IgG, por la fracción Fc de las mismas, es una proteína empleada para evadir la respuesta inmunitaria humoral de los organismos que infecta.

La metodología seguida fue la indicada por el fabricante. Se eliminó la solución de almacenamiento de la columna por centrifugación 30 segundos a 100 xg. Posteriormente se equilibró la columna añadiendo 600  $\mu$ L de tampón de unión (20 mM tampón fosfato, pH 7.0), este tampón se descartó centrifugando 30 segundos a 100 xg.

La unión del anticuerpo a la proteína G se llevó a cabo tras la adición de 600  $\mu$ L de suero e incubando la columna ya cargada durante 5 minutos manteniéndola en agitación durante el tiempo de acoplamiento de las IgGs a la proteína G. Tras esta incubación se centrifugó la columna a 100 xg por 30 segundos. Se realizaron dos lavados con 600  $\mu$ L de tampón de unión, con objeto de arrastrar y eliminar las proteínas del suero no unidos a la matriz de la columna de proteína G.

La elución de las IgGs retenidas, se realizó añadiendo 400  $\mu$ L de tampón de elución (0.1 M glicina-HCl, pH 2,7) en dicho tampón, la elución es instantánea con lo que la recogida de las inmunoglobulinas

se realizó centrifugando la columna y añadiendo 40  $\mu\text{L}$  de tampón de neutralización (1 M Tris-HCl, pH 9,0) a fin de neutralizar el pH ácido.

### **Purificación con Melon™ Gel**

Para experimentos en los que era necesario mantener intacta la parte Fc de las IgG y la glicosilación de las inmunoglobulinas G, se utilizó el kit comercial Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU), cuyo proceso de purificación se realiza en condiciones más cercanas a las fisiológicas, y que mantienen la glicosilación de las inmunoglobulinas intactas.

Para la preparación de las microcolumnas, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Melon™ Gel a una columna cromatográfica vacía (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EEUU) que se centrifugó a 3000  $\times g$  durante 1 minuto, a fin de compactar el gel en la columna. Se realizaron dos pasos de lavado con 300  $\mu\text{L}$  de tampón de purificación proporcionado por el fabricante. El inmunisero fue diluido 1:10 con el tampón de purificación, y colocando 700  $\mu\text{L}$  del suero diluido en la columna, se mezcló en agitación durante 5 minutos. La columna se centrifugó para recolectar los anticuerpos purificados presentes en la elución, ya que el Melon™ Gel retiene todas las proteínas presentes en el suero, excepto las inmunoglobulinas.

### **3.4. Western blotting**

*Western blots* o inmunoblots para la detección de proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos. Las condiciones específicas de los *western blots* realizados se indicarán en los capítulos correspondientes, pero en este apartado se explica el protocolo común realizado en todos ellos.

En primer lugar, para llevar a cabo los *Western blots*, se realizó una separación electroforética vertical (SDS-PAGE) utilizando un gel de acrilamida al 12%, compuesto por un gel concentrador al 5% de acrilamida y un gel separador al 12 % de acrilamida. Como norma general, se resolvieron 30 µg de las proteínas en los diferentes carriles de las electroforesis, utilizando siempre como marcador de peso molecular el PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

Previo a la separación electroforética, a las muestras de proteínas se les agregó 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 β-mercaptoetanol), y se calentaron a 96°C durante 3 minutos, con objeto de desnaturalizar las proteínas, y lograr la homogenización de las cargas eléctricas, haciéndolas homogéneamente electronegativas mediante el detergente iónico SDS y lograr la ruptura de los puentes S-S con el β-mercaptoetanol, para linealizar dichas proteínas y separar las posibles subunidades y así poder separarlas en función de su peso molecular. La electroforesis se realizó en una cubeta sumergida en tampón de electroforesis (0.05M Tris, 385 mM de glicina y 0.01% SDS), usando un voltaje de 70 V durante la corrida en el gel concentrador y de 150 V para la separación en el gel separador.

Tras la realización de la electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo la transferencia de las proteínas, a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Para llevar a cabo la transferencia se aplicó una corriente de 1.3 A, un voltaje de 25V durante 10 minutos en un sistema de transferencia semi seco *Trans blot Turbo* (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

## Metodología

Para realizar el *Western blot*, tras la transferencia, la membrana se bloqueó durante toda la noche a 4°C en agitación empleando una solución de bloqueo (PBS 0.1% Tween 20 + 5% leche desnatada en polvo). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno, utilizando un tampón de lavado (PBS-Tween 20 0.1%).

La membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (la dilución empleada se indicará en cada caso en el capítulo correspondiente) durante 90 minutos en agitación a temperatura ambiente. Se eliminó el anticuerpo primario y se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con tampón de lavado. Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes marcados con peroxidasa a la dilución que indican los fabricantes, la incubación se realizó durante 60 minutos. Transcurrida esta incubación, se realizaron 5 lavados con tampón de lavado se utilizó el sustrato *Clarity® ECL Western substrate* (BioRad, Hercules, CA, EEUU), el cual presenta peróxido de hidrógeno y luminol; la peroxidasa bioconjugada al anticuerpo secundario cataliza la oxidación del luminol por parte del peróxido de hidrógeno, dando como resultado un producto coloreado (3-aminophthalato) y la liberación de luz como subproducto de la reacción, con un máximo de emisión a 425 nm (Thorpe & Kricka, 1986). La reacción se visualizó en un equipo ChemiDoc® (BioRad, Hercules, CA, EEUU).

# 4. Capítulo 1

**Biophysical and Biochemical Comparison of Extracellular Vesicles Produced by Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi***

International Journal of Molecular Sciences. 2021. 22, 5183.

<https://doi.org/10.3390/ijms22105183>

Cuartil: Q1

Índice de impacto: 5,924



## **Biophysical and Biochemical Comparison of Extracellular Vesicles Produced by Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi***

Lisette Retana Moreira 1,2,3,†, Alexa Prescilla-Ledezma 1,4,† , Alberto Cornet-Gomez 1,†, Fátima Linares 5,† , Ana Belén Jódar-Reyes 6, Jorge Fernandez 7 , Ana Karina Ibarrola Vannucci 1,8,9 , Luis Miguel De Pablos 1,\* and Antonio Osuna 1,\*

1 Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular (CTS 183), Departamento de Parasitología, Campus de Fuentenueva, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; lisette.retanamoreira@ucr.ac.cr (L.R.M.); alexap@correo.ugr.es (A.P.-L.); acornetgomez@ugr.es (A.C.-G.); ana\_karinai@hotmail.com (A.K.I.V.)

2 Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 2060, Costa Rica

3 Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, San José 2060, Costa Rica

4 Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá, Ciudad de Panamá 3366, Panama

5 Unidad de Microscopía de Fuerza Atómica, Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada, 18003 Granada, Spain; flinaor@ugr.es

6 Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides (FQM 115), Excellence Research Unit Modeling Nature (MNat), Departamento de Física



Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; ajodar@ugr.es

7 Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; jffernan@ugr.es

8 Unidad de Proyectos, Convenios e Investigación, SENEPA, Ministerio de Salud, 001221 Asunción, Paraguay

9 Departamento de Biotecnología, Universidad Nacional de Asunción, 1039 Asunción, Paraguay

\* Correspondence: lpablos@ugr.es (L.M.D.P.); aosuna@ugr.es (A.O.);

† These authors contributed equally to this work.

## Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are small lipid vesicles released by either any prokaryotic or eukaryotic cell, or both, with a biological role in cell-to-cell communication. In this work, we characterize the proteomes and nanomechanical properties of EVs released by tissue-culture cell-derived trypomastigotes (mammalian infective stage; (TCT)) and epimastigotes (insect stage; (E)) of *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease. EVs of each stage were isolated by differential centrifugation and analyzed using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), dynamic light scattering (DLS), nanoparticle tracking analysis (NTA), electron microscopy and atomic force microscopy (AFM). Measurements of zeta-potential were also included. Results show marked differences in the surface molecular cargos of EVs between both stages, with a noteworthy

expansion of all groups of trans-sialidase proteins in trypomastigote's EVs. In contrast, chromosomal locations of trans-sialidases of EVs of epimastigotes were dramatically reduced and restricted to subtelomeric regions, indicating a possible regulatable expression of these proteins between both stages of the parasite. Regarding mechanical properties, EVs of trypomastigotes showed higher adhesion compared to the EVs of epimastigotes. These findings demonstrate the remarkable surface remodeling throughout the life cycle of *T. cruzi*, which shapes the physicochemical composition of the extracellular vesicles and could have an impact in the ability of these vesicles to participate in cell communication in completely different niches of infection.

Keywords: extracellular vesicles; *Trypanosoma cruzi*; epimastigote; trypomastigote; proteins; trans-sialidase; mechanical properties; atomic force microscopy; zeta-potential

Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 5183. <https://doi.org/10.3390/ijms22105183>  
<https://www.mdpi.com/journal/ijms>

## Introduction

Extracellular vesicles (EVs) are a diverse group of nanovesicles constitutively released by either any prokaryotic or eukaryotic cell, or both. These vesicles are involved in inter-cellular communication and include EVs and ectosomes, among others. EVs are a type of spherical or cup-shaped EV surrounded by a phospholipid bilayer of 30–150 nm in diameter (Bayer-Santos et al., 2014; van der Pol et al., 2012) and originated in multivesicular bodies (MVB) of endocytic origin. Ectosomes are more heterogeneous in shape, larger in diametrical size (0.1–1  $\mu\text{m}$ ) and shed directly from the plasma membrane (Raposo & Stoorvogel, 2013). Their packed and released cargos are very diverse and include lipids, proteins, small metabolites and different populations of RNAs, dsDNA or ssDNA. This composition could vary according to different physiological statuses of the producer cell, such as cancer/non-cancerous cells or infected/non-infected cells by microorganisms (de Pablos Torró et al., 2018; Marcilla et al., 2014; Ofir-Birin et al., 2017; J. Wang et al., 2017).

Some parasites secrete EVs to empower their infectivity due to their ability to induce physiological changes in the cells with which they interact (Retana Moreira et al., 2019) and create an optimal niche at cellular and tissue levels (Atayde et al., 2015; Ofir-Birin et al., 2017; Silverman et al., 2010). *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, is a kinetoplastid protozoan parasite that affects approximately 8 million people globally, with some 300,000 new cases and 15,000 deaths annually (WHO, 2021). The life cycle of the parasite encompasses a series of developmental transformations, including epimastigote forms (non-infective and replicative stage; (E))

in the digestive tract of the infected reduviid bug vector, and bloodstream trypomastigote forms (infective for cells and non-replicative) in the mammalian hosts. The secretion of EVs by this parasite was first reported by da Silveira et al. in 1979 (Da Silveira et al., 1979).

There are several biochemical differences between trypomastigotes and epimastigotes, such as metabolism (Gonçalves et al., 2011), lipid and protein composition of cell membranes (Kaneda et al., 1986; A. I. Sharma et al., 2017) and its ability for division. Other differences include morphological changes such as the posterior or anterior positioning of the flagellum and kinetoplast, as well as the expansion of surface membrane protein glycocalyx of the trypomastigotes compared to epimastigotes. In this sense, MASPs, mucins, gp63 and trans-sialidase (TS) family proteins are over-represented in proteomic, glycoproteomic and RNA expression analysis of trypomastigotes (Atwood et al., 2005; da Silva et al., 2017; Y. Li et al., 2016). Indeed, recent findings have described the release via EVs of trans-sialidase proteins, which are virulence factors implicated in the transfer of sialic acid from host glycoproteins to parasite mucins (San Francisco et al., 2017; Schenkman et al., 1993) and involved in the mechanism of parasite-host cell cytoadherence and invasion (Freire-De-Lima et al., 2015; Lantos et al., 2016; San Francisco et al., 2017; Tonelli et al., 2011). Immunofluorescence analysis using mAb 3F6 against gp82 TS proteins showed the delivery of this type of protein in EVs to host cells, where they probably modulate cellular activity, increasing the parasite's survival and replication (Bayer-Santos et al., 2013). Moreover, during the invasion process of *T. cruzi*, host cells increase their EV shedding in a calcium-dependent manner (Cestari et al.,

2012; Ramirez et al., 2017; Retana Moreira et al., 2019) and load parasite proteins (up to 25% for metacyclic trypomastigotes) in EVs, thus exporting proteins from intracellular stages of the parasite to the extracellular milieu that could be implicated in the pathological outcomes of the infection with *T. cruzi* (Cestari et al., 2012).

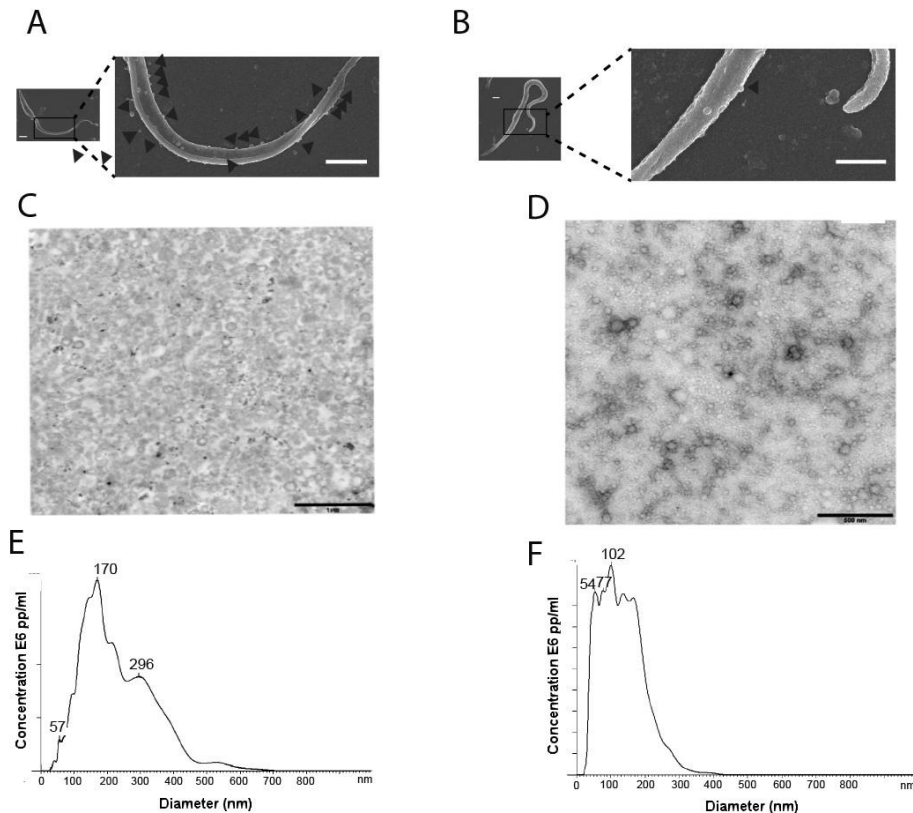
In this work, we performed an extensive characterization and compared proteomes and biophysical properties of EVs produced by the E and tissue-culture cell-derived trypomastigotes (TCT) of *T. cruzi*. The data obtained reflects the drastic changes in the protein composition as well as the nanomechanical properties of the vesicles produced by both stages of the parasite, differences that could have clear implications in the parasite's survival in two radically different biological niches.

## Results

### Purification and Characterization of EVs

To obtain EVs of E and TCT, a procedure including differential centrifugation, coupled to a filtration process through 0.22 µm pore filters and ultracentrifugation was employed (Figure S1). After the isolation and purification process, transmission electron microscopy (TEM) analysis revealed the success of the methodology employed in separating the EVs (Figure 1). Regarding nanoparticle tracking analysis (NTA), the mean size of most of the vesicles secreted by E was 259 21 nm and the mode was 1712 11 nm, while the mean size of the vesicles of TCT was 143 24 nm and the mode was 63 24 nm (Figure 1E,F). These results were similar to measurements obtained by dynamic light scattering (DLS) in the case of EVs of E (mean size: 183 22 nm); however, in the case of the EVs of TCT, the resulting

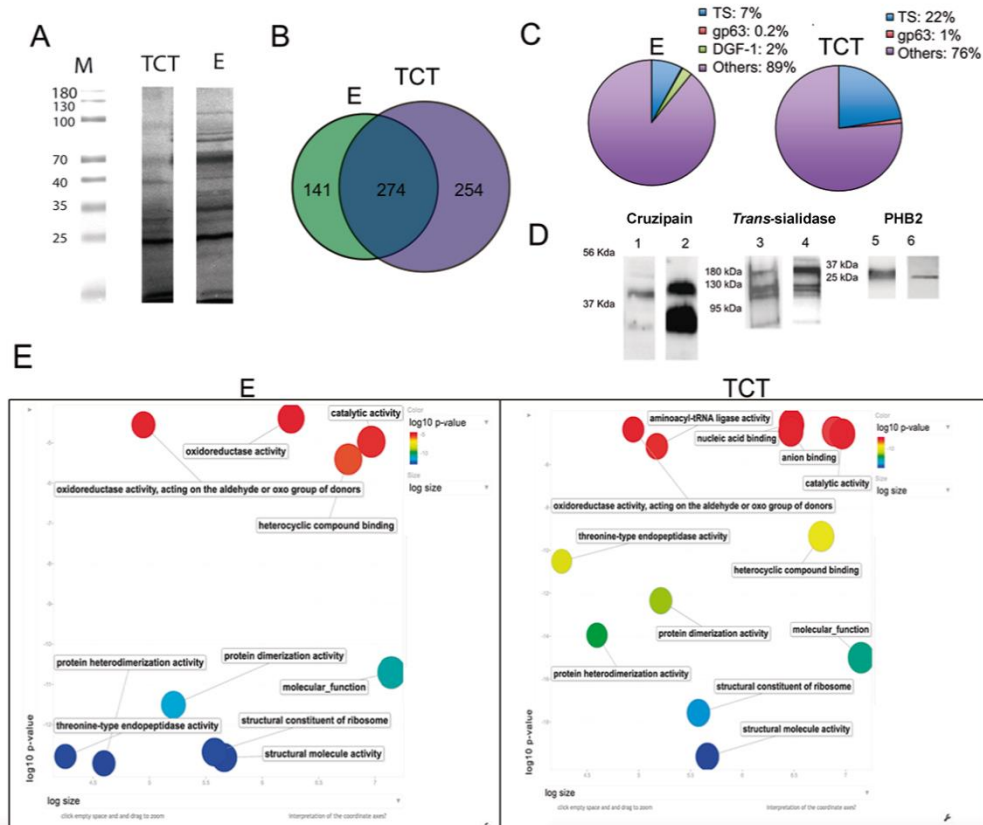
mean size was smaller (60 17 nm). Thus, it is shown that the EVs secreted by TCT seem to be smaller than the EVs of E but both coincide with the reported size of EVs (Figure 1).



**Figure 1.** Purification of the extracellular vesicles (EVs) of epimastigotes (E) and EVs of tissue-culture cell-derived trypomastigotes (TCT) of *T. cruzi* (Pan4 strain, DTU I). Scanning electron microscopy (SEM) of E (A) and TCT (B) employed in this study (scale bar: 1 μm). (C) Transmission electron microscopy (TEM) of purified EVs of E (scale bar: 1 μm). (D) TEM of purified EVs of TCT (scale bar: 500 nm). (E) Nanoparticle tracking analysis (NTA) size distribution of purified EVs of E. (F) NTA size distribution of purified EVs of TCT. Representative figures and graphs of 7 different replicates are shown.

### **Proteomic Profile of EVs of E and TCT**

Western blot analysis using polyclonal anti-*T. cruzi* antibodies revealed numerous proteins with different expression profiles, indicating the different nature of the protein cargos of EVs of E and EVs of TCT (Figure 2A). To generate an overview of the proteomic differences between the EVs of both stages, seven independent biological replicates (four for EVs of TCT and three for EVs of E) of 40 µg purified EVs were subjected to liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). All proteins were searched against UniProt-*T. cruzi* CL Brener database and proteins present in at least two replicates, with two or more peptides identified, were used for further comparisons. As a result, 528 proteins were identified in the EVs of TCT and 415 proteins in the EVs of E (Table S1). In either EVs of E or EVs of TCT, the proteins found have different probabilities for appearance in a given sample (2/3 or 3/3 in E and 2/4, 3/4 and 4/4 in TCT). These results indicate that the protein cargos of EVs are either constitutively present or eventually exported through this route (Figure S2).



**Figure 2.** Qualitative proteomic analysis of the cargos of EVs of E and EVs of TCT of *T. cruzi*. (A) Western blot and differential protein profile of EVs of E and EVs of TCT using polyclonal anti-*T. cruzi* antibodies. (B) Venn diagram of specific and shared proteins of EVs of E and EVs of TCT. (C) Pie chart representing the percentage of proteins of EVs of E and EVs of TCT that belong to multigene families. (D) Western blot analysis for the confirmation of cruzipain, trans-sialidase [8] and prohibitin 2 (PHB2) in EVs of *T. cruzi*: (1) cruzipain in whole lysates of TCT; (2) cruzipain in EVs of TCT; (3) trans-sialidase (mAb 39) in whole lysates of TCT; (4) trans-sialidase (mAb 39) in EVs of TCT; (5) PHB2 in whole lysates of E; and (6) PHB2 in EVs of E. (E) Scatter plot representing Gene Ontology (GO) terms enrichment analysis of proteins of the EVs of E and EVs of TCT, categorized by molecular function ( $p \leq 0.01$ ).

Of those proteins, 274 were present in the EVs of both stages, while 250 proteins (66%) were specific to EVs of TCT and 141 proteins



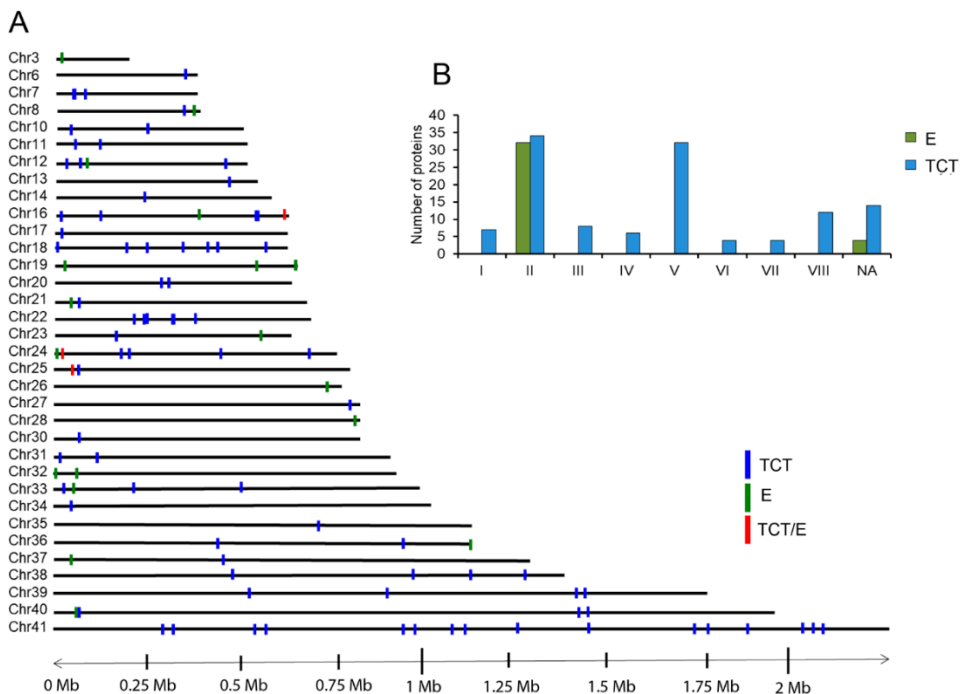
(26.7%) were specific to EVs of E, revealing bigger expansion of TCT specific protein cargos (Figure 2B). These differences were mainly due to a differential and selective enrichment of surface proteins released by the TCT stage. Particularly, 23% of the proteome of EVs of TCT encompasses surface proteins belonging to multigene families, whereas only 9.2% of the proteome of EVs of E exhibits these kinds of proteins (Figure 2C). To confirm these results, antibodies against TS, cruzipain and PHB2 proteins were employed, and the presence of these proteins in EVs of TCT, and PHB2 protein in EVs of E, was detected (Figure 2D). The results also show stage-specific multigene surface protein cargos such as DGF-1 proteins, which were exclusively present in the EVs of E (2% of the protein content), and gp63 surface proteins only present in the EVs of TCT (1% of the protein content) (Figure 2C). In our analysis, we did not find proteins from other surface families such as mucins or MASPs.

In order to search for differential enzymatic activities, the proteomes of EVs of TCT and EVs of E were analyzed for differential Gene Ontology (GO) enrichments ( $p \leq 0.01$ ). As shown in Figure 2E, both proteomes showed similar patterns in many of the molecular activities contained with enrichments of threonine-type peptidase activity (GO:0070003), structural constituents of the ribosome (GO:0003735) and aminoacyl-tRNA ligase activity (GO:0004812). However, the analysis also showed a differential enrichment with 22 GO terms in EVs of TCT versus 12 for EVs of E (Table S2). Moreover, some enrichments such as purine ribonucleoside triphosphate binding (GO:0035639) or coenzyme binding (GO:0050662) were only significant in EVs of TCT.

Finally, the proteomic composition of EVs of TCT and EVs of E of the *T. cruzi* Pan4 strain employed in this study was compared to the previous proteome dataset from Bayer Santos et al. (2013), obtained from the *T. cruzi* DM28c strain (DTU I) [24]. The latter analyzed EV protein cargos in different vesicle fractions called V2, with a mean size of 131 nm (epimastigotes) and 143 nm (metacyclic trypomastigotes), and V16, with vesicles of 74 nm (epimastigotes) and 87 nm (metacyclic trypomastigotes). These fractions fall within the range of the exosome fractions of our study (see above). Surprisingly, only 26.7% of the protein content of EVs of E was shared between proteomes and 28% of the proteins of the EVs of metacyclic trypomastigotes were present in the EVs of TCT of the Pan4 strain (Figure S3).

### **Composition, Variability and Location of TS Proteins in EVs of E and TCT**

Among surface proteins, TS proteins showed the highest levels of protein diversity of EVs of TCT, comprising 22% of the total composition and 7% of the total cargo of EVs. To evaluate the TS protein composition, the proteins of the Pan4 strain identified in CL-Brener's proteome were classified in the TS groups I–VIII proposed by Freitas et al. (2011) (L. M. Freitas et al., 2011). Extracellular vesicles of TCT showed high variability and co-expression of multiple TS ( $n = 121$ ), with proteins falling within all TS groups (I–VIII), whereas the TS cargos in EVs of epimastigotes were far less abundant ( $n = 33$ ) and restricted to group II (Figure 3).

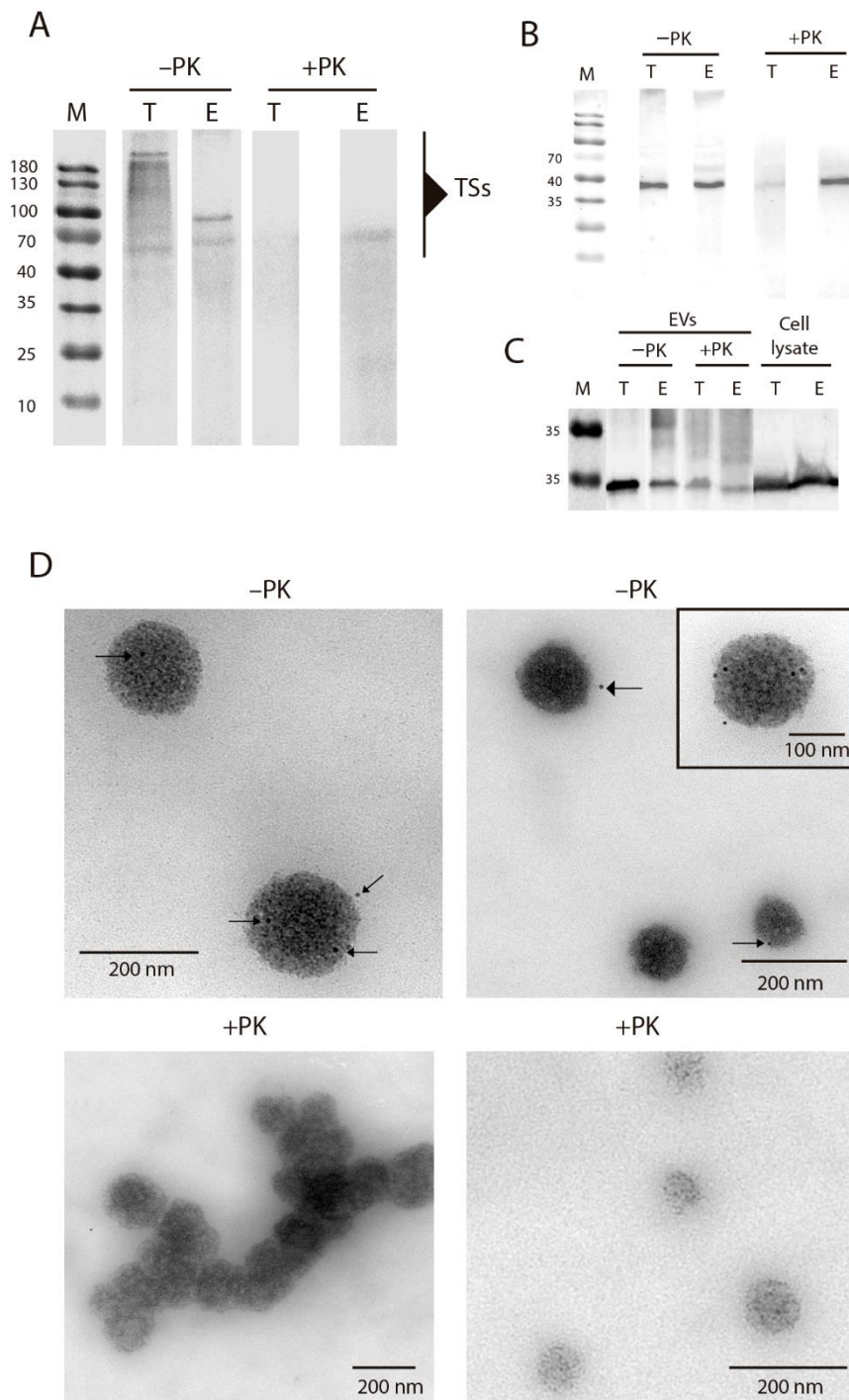


**Figure 3.** Mapping of TS proteins found in EVs of E and EVs of TCT of *T. cruzi* Pan4 strain on *T. cruzi* CL-Brener strain chromosomes. (A) Genomic mapping of TS on chromosomes represented as blue bars for TS of trypomastigote forms derived from cell cultures, green bars for TS of epimastigotes or red bars for TS genes present in both stages (TCT: n = 121; E: n = 33). (B) Bar graph representing the TS proteins found in the EVs of TCT and EVs of E and categorized for the CL-Brener strain in groups I–VII, according to (L. M. Freitas et al., 2011).

TS were also mapped on *T. cruzi* chromosomes to determine whether or not there was an association between the TS expression and chromosomal location among EVs of E and EVs of TCT. As observed in the same figure, TSs of the EVs of TCT were randomly distributed all across *T. cruzi* chromosomes. In contrast and strikingly, TSs of EVs of E showed a clear bias towards both chromosomal ends (82%, 17/20 TS), indicating a restrictive expression pattern of the TS group II in epimastigotes. It was also demonstrated that the TS protein cargos

of EVs are also either constitutively present or eventually exported through the exosomal route in E and TCT, as shown in Figure S4.

Finally, with the aim of eliminating proteins present at the surface of EVs and to ascertain whether or not TS proteins are membrane-bound cargos, EVs of E and EVs of TCT were treated with proteinase K and analyzed by Western blot and TEM, using immunogold labelling (Figure 4). While the untreated EVs of TCT (-PK) showed the characteristic TS pattern of high molecular weight proteins (Figure 4A), in the case of EVs treated with proteinase (+PK), the TS residues were practically removed, with only a minor band of approximately 65 kDa that also appears in the untreated EVs of E. This band could correspond to a protein or a domain of the TS possibly vehiculated inside the membranes of the EVs. Similarly, in the immunogold labelling, EVs untreated with proteinase K showed gold marks on their surface that were not present in EVs treated with the proteinase (Figure 4C). The presence of other parasite-specific proteins like cruzipain (gp57/51) was not affected by the treatment, which indicates that the enzyme could be located inside the vesicles, therefore being inaccessible to the treatment with proteinase K (Figure 4B).



**Figure 4.** Location of TS proteins on the surface of EVs of *T. cruzi*. (A) Western blot of EVs of E and EVs of TCT treated/untreated (+PK/-PK, respectively) with

proteinase K and incubated with anti-TS antibodies. All lanes were loaded with an equal amount of protein (30 µg). (B) Western blot of EVs of E and EVs of TCT treated/untreated (+PK/-PK, respectively) with proteinase K and incubated with anti-cruzipain antibodies. All lanes were loaded with an equal amount of protein (30 µg). (C) Western blot of EVs of E and EVs of TCT treated/untreated with proteinase K and whole lysates of TCT and E incubated with anti-calmodulin antibodies. All lanes were loaded with equal amount of protein (30 µg). (D) Immunogold labeling of TS proteins in EVs of TCT treated/untreated with proteinase K. Black arrows indicate the gold particles and thus TS location.

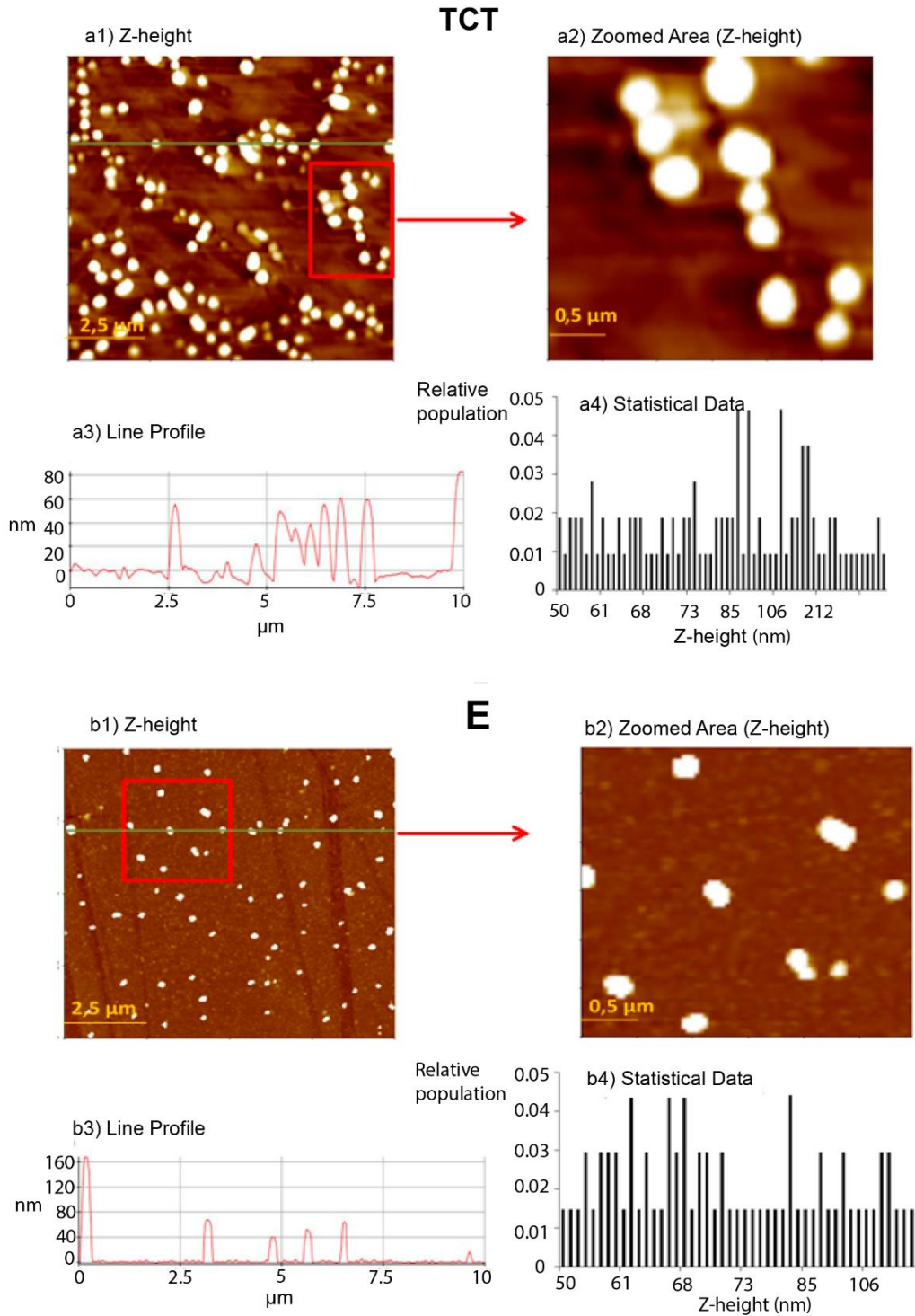
Results obtained in these experiments confirm the presence of TS proteins on the surface of EVs, regardless of the group (I–VI) they belong to. This location of TS on the surface of EVs would be similar to what occurs on the surface of the parasite, where TSs are bound to the membrane (Schenkman et al., 1992). Besides, it was also proved that the EV's integrity is not compromised after the treatment with proteinase K.

## **Biophysical Properties of EVs of E and TCT**

### **Atomic Force Microscopy (AFM) Analysis Topographic Measurements and Imaging**

AFM was employed to determine different nanomechanical parameters (Young modulus, stiffness and adhesion) of EVs of TCT and EVs of E of *T. cruzi* at the nanoscale level. Besides, AFM was also applied for assessing topographic measurements of EVs of both stages of the parasite. The morphology of EVs under TEM and AFM is shown in Figures 1 and 5, respectively. Under our experimental conditions, significant amounts of EVs were obtained in both types of analysis. AFM analysis of freshly prepared EV samples revealed the presence of particles of heights between 50 and 200 nm for TCT and

50 and 160 nm for E, and correspond to monomeric species rather than aggregates (Figure 5a,b). Such observations further support the statistical data shown for both types of samples in the same figure.



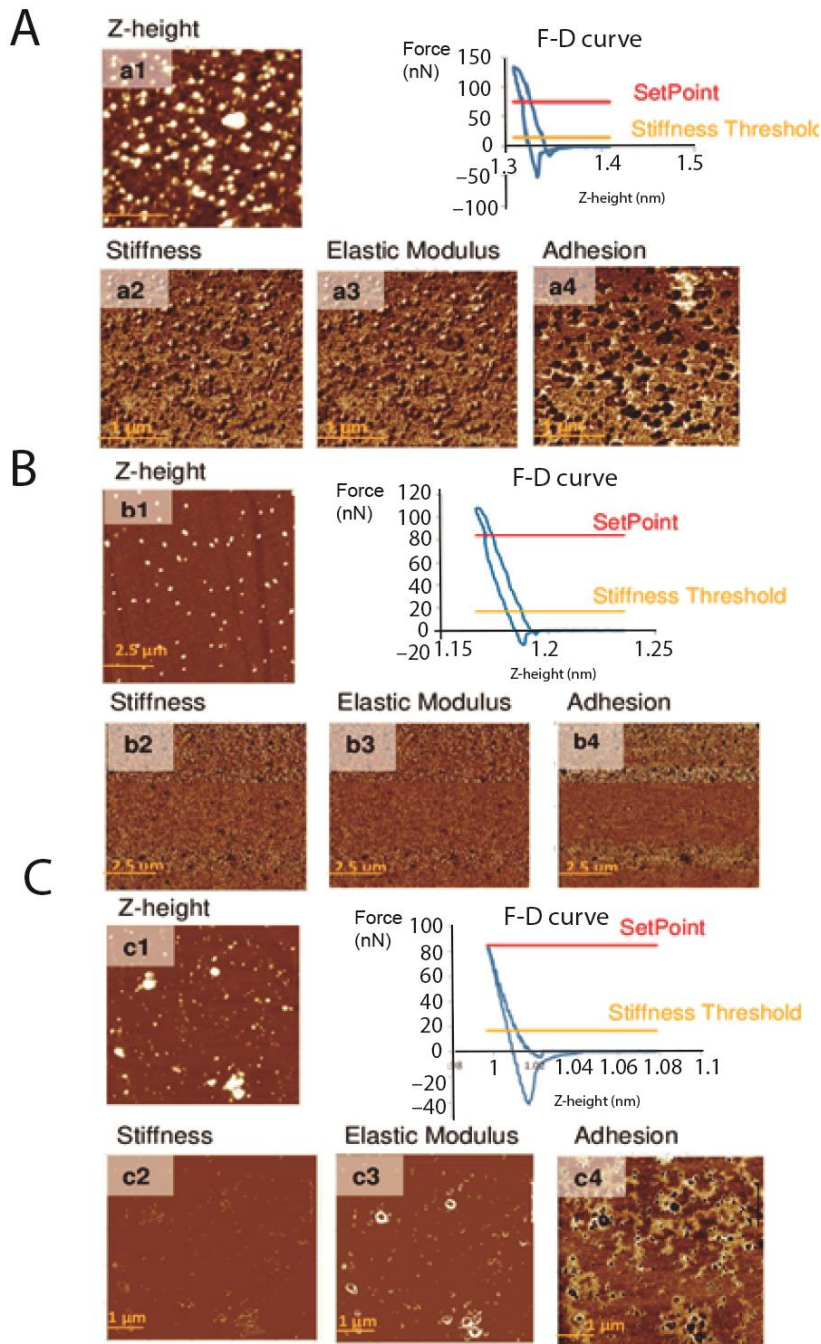


**Figure 5.** Representative images of EVs of TCT (a) and EVs of E (b) of *T. cruzi* Pan4 strain. (a1) Z-height image of EVs of TCT; (a2) zoomed area from image a1; (a3) line profile for the green line in the topography image (Z-height is in the range 40–80 nm) and (a4) statistical data of the relative frequency of the Z-height (nm). (b1) Z-height image of EVs of E; (b2) zoomed area from image b1; (b3) line profile for the green line in the topography image (Z-height is in the range 40–160 nm) and (b4) statistical data of the relative frequency of the Z-height (nm).

The morphology of EVs could be described as globular for both stages of the parasite. Although spanning a range generally between 1 and 10 nm (Figures 5(a1,b1)), the majority of these species have an average width of 20–90 nm in the case of TCT, and 30–113 nm in E. These results are in accordance with TEM and NTA results (Figure 1C–F).

### Force Spectroscopy

AFM was also employed for analyzing nanomechanical properties of EVs of E and TCT of *T. cruzi*, as previously mentioned. The purpose of including force spectroscopy studies was to compare nanomechanical properties for both types of samples isolated from different stages of the parasite: the elastic modulus, adhesion and stiffness. The measurements performed by AFM were carried out using the PinPoint mode, in which the tip touches the surface and is lifted after each pixel to improve friction and noise in the images, but result in F–D curves in different points of interest (*vide infra* Supplementary Materials). By using this mode, it is possible to study the details of material components and to perform distribution maps of material components. The analysis of the F–D curves allowed extracting the data regarding nanomechanical properties shown in this work (Figure 6).



**Figure 6.** Atomic force microscopy Z-height images and nanomechanical maps showing stiffness, elastic modulus and adhesion profile of EVs of TCT (A), EVs of E (B) and EVs of TCT treated with proteinase K (C).

Results revealed differences in the adhesion of EVs of E, compared to EVs of TCT (adhesion: 19.894 vs. 39.667 nN and 41.200 nN when treated with proteinase K). On the other hand, assessment of stiffness and Young modulus showed a higher value in the case of EVs of E (20.471 N m<sup>-1</sup> and 2.605 GPa, respectively) and EVs of TCT treated with proteinase K (57.581 N m<sup>-1</sup> and 6.351 GPa, respectively), when compared to the values of EVs of TCT (13.913 N m<sup>-1</sup> and 1.111 GPa, respectively) (Table 1). These results suggest that adhesion, as well as the stiffness and the elastic modulus of EVs are different between the two stages of the parasite and that the treatment of EVs of TCT with proteinase K modifies some of these properties.

**Table 1.** Nanomechanical properties of EVs of TCT, EVs of E and EVs of TCT after the treatment with proteinase K \*.

Sample Type	Stiffness (N m <sup>-1</sup> )	Elastic Modulus (GPa)	Adhesion (nN)
EVs of TCT	13.913 ± 02.783	1.111 ± 0.218	39.667 ± 07.140
EVs of E	20.471 ± 04.709	2.605 ± 0.706	19.894 ± 02.163
EVs of TCT +PK	57.581 ± 05.043	6.351 ± 0.896	41.200 ± 04.293

\* For each type of sample, measurements were repeated in 3 different zones and F–D curves were recorded for each pixel, of which 10 different points per zone have been assessed. This assumes a total of 30 different values averaged to give the final results indicated in the table.

### Measurement of zeta-potential (ZP)

To characterize the surface electrical charge of EVs of E and TCT of *T. cruzi*, ZP was measured in different samples. Determinations of the ZP of EVs treated with proteinase K (+PK), to remove proteins coating

the vesicle; sodium periodate, to oxidize the carbohydrate of surface glycoproteins (+SP); and fetuin, a glycoprotein rich in sialic acid, were also included. Results are shown in Table 2.

**Table 2.** Zeta-potential of EVs of TCT, EVs of E and EVs of TCT after the treatment/incubation with different reagents/proteins \*.

Sample Type	Zeta-Potential (mV)
EVs of TCT	-16 ± 4
EVs of E	-18 ± 8
EVs of TCT + PK	-18 ± 6
EVs of TCT + SP	-17 ± 4
EVs of TCT + fetuin	-19 ± 5

\* Results consist of the average of 3 ZP values, obtained after 3 different measurements by the instrument. The corresponding error is the mean of the errors of each of these independent measurements, which is obtained as a standard deviation of the zeta potential distribution resulting from that measurement. In turn, each ZP measurement given by the instrument is the mean of a ZP distribution (the corresponding error is the standard deviation) obtained by the software from 3 internal measurements and each of these internal measurements is at its own expense.

## Discussion

The quantity, surface molecular composition and dynamics of EVs released by cells changes upon the physiological status of the producer cell. Comparing the properties of the EVs released by two life cycle stages of a parasite, with different strategies for survival and thus, different communicators, is essential for understanding the adaptation of these unicellular organism to distinct environments within the insect vector or the mammalian host (Akers et al., 2013; Théry et al., 2009).

In 2010, Sharma et al. described EVs as structures with a non-homogeneous surface, tentatively attributable to the presence of

either proteins, mRNA, or both, enclosed inside the lipid membrane (S. Sharma et al., 2010). Besides, Woo et al. (2016) confirmed the globular shapes of these extracellular vesicles (Woo et al., 2016) from mammalian cells, while comparing how different isolation methods affect the surface structure and size of EVs. To our knowledge, this is the first report regarding the characterization of EVs isolated from different stages of *T. cruzi*—including EVs submitted to different treatments/incubations—using AFM, a technology that exhibits substructural organization irresolvable by electron microscopy, including a description at the nanoscale level. Our results using AFM show the globular shape of the vesicles and confirm their integrity, in which intact, non-aggregated EVs were obtained after the isolation protocol described.

Additionally, a clear association in the protein composition of EVs of TCT and EVs of E (particularly of trans-sialidase proteins) and changes in adhesion, stiffness, elastic modulus, and zeta-potential was found. In this study, EVs of TCT showed higher adhesion values than EVs of E and the lowest stiffness and elastic modulus values. These results could suggest that proteins on the vesicle's surface play an important role in these biophysical properties. In this sense, differential biophysical features of the EVs may be related to the glycocalyx of the EVs of TCT, which includes a dense layer of surface glycoproteins, many of them linked to GPI present in the membrane with highly adherent properties. Moreover, the vast majority of proteins found and enriched in EVs of TCT are predicted to be highly glycosylated and this fact would mediate interactions with lectins and receptors from the host cell membrane with carbohydrate residues, including sialic acid. Moreover, the lipid composition—mainly the

amount of phospholipids and sterols—regulate the fluidity of the membrane. Therefore, differences found in the elastic modulus, together with the lower number of proteins present in the EVs of the epimastigote stage could be related to the higher content of sterol in the membrane of these forms (A. I. Sharma et al., 2017). Differential properties in stiffness and adhesion in metabolically different malignant (metastatic and non-metastatic) cell-derived EVs compared to non-malignant cells has been reported (Midekessa et al., 2020) and it is known that biomechanical properties of vesicles may play an important role in exocytosis and in intercellular transport (Théry et al., 2009).

The zeta-potential in a dispersed system is a measure of charge stability and affects particle-particle interactions (Beit-Yannai et al., 2018). As the electrical charge of the surface of EVs is reflected in the zeta-potential, it could be considered as a characteristic of the population of EVs. This electrical charge of the vesicles will depend, among others, on a series of factors: ionization of the components bound to the surface of the membrane, the chemistry of the grafted chains (if any), protonated states, inter and intramolecular bonds, presence of H bonds and the adsorption of ions of the electrolytes present in the solution in which they are found (Midekessa et al., 2020). In our study, the slight differences shown in the standard deviation of the negative zeta-potential, higher in the case of EVs of E when compared to EVs of TCT, could indicate a wider distribution in the vesicles produced by these forms. Compatible with the size distribution observed by NTA, the samples of the EVs of E showed greater variability in both zeta-potential and size.

The sialic acid, once transferred from proteins sialylated by TS to the surface glycoproteins of the EVs, would increase the final electronegativity of EVs during the interaction with the cell membrane. As reported elsewhere, the zeta-potential of EVs of cancer cells was found to be higher than that of normal cells, and the large negative charge of cancer EVs was due to the large amount of sialic acids (Akagi & Ichiki, 2016; Whitehead et al., 2015). In a similar way to the slight differences found in EVs treated and untreated with proteinase K, the zeta-potential in EVs from cancer cells also show negative shifts compared to EVs from normal cells owing to abnormal expression of glycoprotein sugar chains due to malignant transformation which would mediate an increase in the adhesion properties of the vesicles (Akagi & Ichiki, 2016). Thus, the change observed after the reduction of sugars with sodium periodate would indicate that both proteins and oligosaccharides that are part of the glycocalyx of EVs with N-acetyl glucosamine O-linked oligosaccharides (that can be either sialylated by the parasite trans-sialidases or modified by  $\alpha$ -galactose) could determine the net charge of these vesicles. Therefore, the differences in the electrostatic properties of EVs of *T. cruzi* could have outstanding importance since they may dictate the fate of the EVs of the parasite by targeting them to the plasma membrane of cells in tissues. Sialic-acid-rich regions would increase the negative charge on EVs as previously reported, if comparing the zeta-potential of EVs derived from cancer cells with or without the treatment with neuraminidase (Akagi & Ichiki, 2016) and the increase in the electronegativity of EVs of TCT after being incubated with a glycosylated protein like fetuin, with three N-linked and three O-linked oligosaccharide chains, whose terminal sugar

residues are rich in sialic acid (H. Wang et al., 1998). The latter would imply the transfer of sialic acid from glycosylated proteins to sugars to the glycocalyx of the vesicles.

The proteome analysis of EVs of TCT and EVs of E indicate that the surface remodeling of the EVs described above is accompanied by a remarkable change in their protein cargos, particularly of TS surface proteins. Trans-sialidases are a highly polymorphic surface protein family (of around 1400–1700 genes, depending on the *T. cruzi* strain), divided into VIII groups, with only 15 genes encoding enzymes with potential catalytic activity (Atwood et al., 2005; L. M. Freitas et al., 2011).

The treatment of EVs with proteinase K clearly shows that TSs released via the exosomal pathway have a surface location. This suggests that the TS family of proteins will be in direct contact with the external milieu during the lifetime of the released EVs. It is noteworthy, that the percentage of TS proteins (22% vs. 7% in EVs of TCT and E, respectively) and the diversity of TS members (groups I–VI vs. group II in EVs of TCT and E, respectively) is remarkably increased in EVs of TCT. Due to the size (80–200 KDa) (El-Sayed et al., 2005; Torrecilhas et al., 2020) and that they are heavily glycosylated, it could be suggested that they should have an impact on the different mechanical properties found in EVs of both stages.

Noteworthy, only the EVs from TCT carry TS proteins with catalytic activity (group I). Indeed, the proteomic analyses of the EVs of TCT have revealed the presence of the highly antigenic shed acute antigen (SAPA) belonging to TS group I, which presents C-terminal extensions which were suggested to protect the catalytic enzymatic activity as



well as high reactivity of IgG and IgM antibodies against this protein (Herrerros-Cabello et al., 2020). In accordance with this data, previous works showed that E forms have a depletion of sialylated mucin acceptors (Schenkman et al., 1994), and a reduction transfer of sialylated products, since TS catalytic activity is 83% lower compared to the T stage (Urban et al., 2011). The results found in the EVs of TCT would confirm the presence of TS proteins with a potential catalytic activity which would favor the propagation and survival of the T forms infecting forms via the removal of sialic acid from host cell donors that could be either exploited either via cell surface, EV release, or in combination. Physiological effects associated with this TS activity such as thrombocytopenia, apoptosis of immune cells in the spleen, thymus and peripheral lymph nodes (de Lederkremer & Agusti, 2009; Tribulatti et al., 2005) could be related to the action of enzymatically active TS on the surface of EVs of *T. cruzi*.

Group II of TS encompasses proteins related to adhesion and infection in the trypomastigote stage, such as SA-1, SA85, gp90, gp82 and ASP-2 (L. M. Freitas et al., 2011). Another group of TS proteins described in the proteome of the EVs of TCT with known activity are the complement regulatory proteins (CRP) (TS group III) that inhibits alternative and classical pathways of complement activation (Beucher & Norris, 2008; De Pablos & Osuna, 2012), thus providing these EVs with a potential role in evading immune system targets in the parasite (Cestari et al., 2012; de Pablos Torró et al., 2018; Norris et al., 1991). Moreover, EVs of TCT also displayed Tc13 (TS group IV), which is highly expressed in metacyclic and TCT and are able to bind  $\beta$ 2-adrenergic receptors and modify myocardial contractile activity (de Pablos Torró et al., 2018; García et al., 2003; Joensen et al., 2003;

Nardy et al., 2016; Norris et al., 1991). In this sense, the EVs of TCT have shown the ability to interact with this receptor [8], a fact that may be mediated by the exposure of the Tc13 protein on the surface of EVs. The functionality of all other members of the proteome of the EVs of T forms falling in the other TS groups remains poorly characterized; however, one might think that the polymorphic structure of TS family will confer a high diversity of roles for the EVs secreted by trypomastigotes.

Other difference arose after analyzing TS protein expression and chromosome mapping, in which TS exposed over the surface of the EVs of TCT have a random distribution across the genome, with the exception of group II of TS. In this regard, specific associations of class II TS of EVs of E (and TS class II shared with EVs of TCT) with telomeric regions have been found and this could indicate a precise regulation of (I) protein expression or (II) protein location and cargos through the EVs' compartments. As commented on above, group II of TS has been extensively studied and described and they have functions related to host-parasite interactions thus exposed to high environmental pressures, which may require constant rearrangements at the subtelomeric regions as suggested by Freitas et al. (L. M. Freitas et al., 2011).

Interestingly, the finding of this regulatory pathway could be explained by differential regulation due to differences in TS UTRs between TCT and E (L. M. Freitas et al., 2011). Here, the expression of all TS groups in the EVs of TCT is correlated to the data reported by Freitas et al. (L. M. Freitas et al., 2011), where they show that all TS groups have potential antigenic properties when exposed to sera from

infected mice and thus expressed at some point by the trypomastigote stage.

## **Materials and Methods**

### **Cell Culture, Parasite Strain and Stages**

Vero cells (ECACC 84113001) were cultured in Nunc cell-culture flasks of 75 cm<sup>2</sup> surface area (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) in Minimum Essential Medium (MEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Waltham, MA, USA) previously inactivated at 56 °C for 30 min (iFBS), plus antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL). The cultures were maintained at 37 °C, in a moist atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub>.

*Trypanosoma cruzi* Pan4 strain (Tcla + Tcld) was employed in this work. This strain was isolated from a patient from Panama during 2004. The epimastigote stage of the parasite was cultured in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, at 28 °C. Trypomastigote forms derived from cell cultures were obtained from infected Vero cell cultures as previously described (Campelo et al., 2015; Cura et al., 2010; Díaz Lozano et al., 2017; Osuna et al., 1986).

### **Isolation and Purification of EVs of TCT and EVs of E of *T. cruzi***

#### **Isolation of EVs**

Trypomastigotes of the Pan4 strain were obtained after the infection of cultured Vero cells with purified metacyclic trypomastigotes. The

infections were performed in Nunc cell culture flasks of 75 cm<sup>2</sup> surface area with MEM supplemented with 10% IFBS plus penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 120 h of the intracellular development of the parasite, the culture media containing the trypomastigote forms derived from cell cultures were collected and centrifuged at 3000 g for 5 min. The pellet with trypomastigotes was washed in sterile phosphate buffer saline (PBS) four times.

The purification of EVs from TCT and E was performed following the methodology previously described by Díaz Lozano et al. [51] and Retana Moreira et al. (Retana Moreira et al., 2019). Briefly, 5x10<sup>7</sup> TCT of *T. cruzi* were incubated for 5 h in 5 mL Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) buffered with 25 mM HEPES, pH 7.2, and supplemented with 10% exosome-free iFBS obtained after centrifugation at 100,000 x g during 16–18 h. After this time, the parasites were removed by centrifugation at 3500 x g for 15 min and the supernatant was collected and centrifuged at 17,000 x g for 30 min at 4°C, in order to remove eventual apoptotic blebs and cell debris. The 17,000 x g supernatant was filtered through a 0.22 µm pore filter (Sartorius, Göttingen, Germany) and ultracentrifuged at 100,000 x g for 16–18 h in an ultracentrifuge Avanti J-301 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with a JA-30.50 Ti rotor. The resulting pellet was washed three times in sterile PBS in an ultracentrifuge Sorwal WX80 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with F50L-24 x 1.5 fixed-angle rotor and resuspended in 100 µL PBS. The viability of the TCT after shedding of EVs was evaluated using the trypan blue exclusion test. After 5 h, no significant death was detected and over 99% of the

parasites were viable. For the isolation of EVs from E,  $5 \times 10^7$  parasites were incubated for 5 h at 28°C in LIT culture medium with 10% exosome-free IFBS. After a 5 h incubation, the parasites were centrifuged at 3500 x g for 15 min and the supernatant was submitted to the protocol recently described for the isolation of EVs from TCT. The EVs were washed 3 times in PBS, resuspended in 100 µL PBS plus cOmplete, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-free protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) and stored at -80°C. The isolation procedure is summarized in Supplementary Figure S1. This figure contains images and graphs of the size of the vesicles from the pellets of the purification process.

The isolation procedure was evaluated by transmission electron microscopy, atomic force microscopy, dynamic light scattering and nanoparticle tracking analysis. The protein concentration from each sample of EVs was quantified using the Micro-BCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), as described elsewhere (Retana Moreira et al., 2019). For the proteomic analysis, the incubations of each stage of the parasite were performed in culture media without iFBS and the protein concentration obtained under the conditions described above were 13.1 µg for EVs of E and 16.7 µg for EVs of TCT.

### **Transmission Electron Microscopy**

For TEM, EVs obtained as described above were fixed in Karnovsky's fixative (Théry et al., 2009) (2.5% glutaraldehyde (v/v) and 2% formaldehyde (v/v) in 0.1 M cacodylate buffer; 50 mg of CaCl<sub>2</sub> in 100 ml) at 37°C for 30 min, dehydrated and embedded in Spurr resin (Sigma, Ronkonkoma, NY, USA). After performing the ultra-thin

sections, they were stained with 8% uranyl acetate (vol/vol) followed by 0.2% lead citrate (v/v) and visualized on a Carl Zeiss LIBRA 120 PLUS SMT electron microscope.

Samples of EVs treated with proteinase K were negative stained and submitted to immunogold labelling for the detection of trans-sialidases using the anti-trans-sialidase antibody (mAb 39). In this case, aliquots of the purified EVs were resuspended in 30  $\mu$ L Tris-HCl (pH 7.3) and 5  $\mu$ L of the suspension was adsorbed directly onto Formvar/carbon-coated grids. After 30 min, the grids were washed three times for 10 min in PBS and fixed in 1% glutaraldehyde for 30 min. The grids were then washed three times in PBS, blocked for 30 min in a solution of 0.02 M glycine prepared in 0.1 M PBS (pH 7.3) and blocked for 30 min with blocking buffer (0.05% Tween in PBS, pH 7.4, plus 1% non-fat milk). After this time, the grids were incubated with the anti-trans-sialidase antibody (mAb 39) (1:50) and the anti-mouse IgG (whole molecule)-gold (20 nm) labelled antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 2 h for each incubation. The final contrast was performed with 2% (v/v) uranyl acetate, as previously reported (Campelo et al., 2015; Osuna et al., 1986).

### **Dynamic Light Scattering and Nanoparticle Tracking Analysis**

DLS analysis of isolated EVs of TCT and EVs of E were performed using a Zetasizer nano ZN90 (Malvern Panalytical, Worcestershire, UK) and measured at 25 °C. For data acquisition and information processing, Zetasizer Ver. 7.11 software was employed. The hydrodynamic size distribution of the purified EVs was measured by NTA, using an instrument equipped with a sample chamber, a 405-nm

laser and a high-sensitivity complementary metal-oxide-semiconductor (CMOS) camera. The samples were diluted in 0.22 µm filtered PBS up to 1 ml and then, loaded into the chamber. Three 60 s videos, in Brownian mode, were recorded and analyzed for each sample with NTA 2.3 image-analysis software (NanoSight Ltd., Amesbury, UK). Measurement conditions were manual shutter, gain, brightness and threshold adjustments at 25 °C. The mean size distribution was calculated as a mean of three independent size distributions.

### **Scanning Electron Microscopy of TCT and E**

SEM was performed according to Díaz Lozano et al. (Díaz Lozano et al., 2017). Briefly, the parasites were placed over 13-mm round coverslips (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany), in Nunc 24-well plates (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). After 4 h, the coverslips were fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer with 0.1 M saccharose and maintained in the fixative solution for 24 h at 4°C. After this time, the samples were dehydrated in a graded series of ethanol, desiccated using a critical point dryer (LEICA EM CPD 300) and evaporated with a high vacuum carbon coater (EMITECH K975X). Finally, the samples were carbon-coated for 3 min and observed in a ZEISS Supra microscope.

### **Enzymatical and Chemical Treatment of EVs**

EVs (40 µg) of TCT of *T. cruzi* were treated with proteinase K (final concentration 0.5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min at 37°C in agitation, according to Retana Moreira et al. (2019). The suspension was then washed twice performing 100,000 x g ultracentrifugation steps for 4 h, removing the supernatant containing

the proteinase K. The pellet with EVs was then resuspended in 0.22 µm filtered PBS with protease inhibitors (cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail) (Roche, Basel, Switzerland).

To reduce the glycoconjugates surrounding the EVs, treatment with sodium periodate was applied. In this case, EVs were incubated with 10 mg/mL of the reagent for 90 min at room temperature in the dark. After the incubation, EVs were washed as described above. Samples of EVs of TCT were also incubated in a solution containing 100 µg/mL fetuin, a glycosylated protein rich in sialic acid (N-acetylneuraminic acid), in MEM, for 90 min. The samples were subsequently washed twice.

### **Proteomic Analyses of EVs from TCT and E**

Samples of EVs were concentrated by adding 4 volumes of cold acetone to each sample and incubating overnight at 20°C. After this time, acetone was removed by centrifugation at 13,000 x g for 10 min at 4°C and two washing steps in 1 mL of cold acetone were performed. The acetone was removed with a mixture of nitrogen and air stream and the samples were stored dried at 80°C until proteomic analyses.

Protein extracts from EVs of 4 biological replicates of TCT and 3 biological replicates of E (40 µg/sample) were resuspended in a volume up to 50 µL of sample buffer, and then applied onto 1.2-cm wide wells of a conventional SDS-PAGE gel (0.75 mm thick, 4% stacking and 10% resolving). The run was stopped as soon as the front entered 3 mm into the resolving gel, so that the whole proteome became concentrated in the stacking/resolving gel interface. The unseparated protein bands were visualized by Coomassie staining,



excised, cut into cubes (2 x 2 mm), and placed in 0.5 mL microcentrifuge tubes (Moreno et al., 2014). The gel pieces were destained in acetonitrile:water (ACN:H<sub>2</sub>O, 1:1) and disulfide bonds from cysteinyl residues were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT) for 1 h at 56°C. Then, thiol groups were alkylated with 50 mM iodoacetamide for 1 h at room temperature in the darkness and digested in situ with sequencing grade trypsin (Promega, Madison, WI, USA) as described by Shevchenko et al. in 1996 with minor modifications (Shevchenko et al., 1996). The gel pieces were shrunk by removing all liquid using sufficient ACN. Acetonitrile was pipetted out and the gel pieces were dried in a SpeedVac™. The dried gel pieces were re-swollen in 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.8 with 60 ng/μL trypsin at 5:1 protein:trypsin (w/w) ratio. The tubes were kept in ice for 2 h and incubated at 37°C for 12 h. Digestion was stopped by the addition of 1% trifluoroacetic acid (TFA). Whole supernatants were dried down and then desalted onto ZipTip C18 pipette tips (Millipore), OMIX pipette tips C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) or OASIS C18 columns (Waters) until mass spectrometric analysis.

The desalted protein digest was dried, resuspended in 10 μL of 0.1% formic acid and analyzed by reversed-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry (RP-LC-MS/MS) in an Easy-nLC II system coupled to an ion trap LTQOrbitrap-Velos-Pro hybrid mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The peptides were concentrated (on-line) by reverse phase chromatography using a 0.1 mm 20 mm C18 RP precolumn (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), and then separated using a 0.075 mm 250 mm C18 RP column (Thermo Fischer Scientific,

Waltham, MA, USA) operating at 0.3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Peptides were eluted using a 240-min dual gradient from 5 to 25% solvent B for 180 min followed by a gradient from 25 to 40% solvent B over 240 min (Solvent A: 0.1% formic acid in water; solvent B: 0.1% formic acid, 80% acetonitrile in water). Electrospray ionization (ESI) ionization was performed using a Nanobore emitters Stainless Steel ID 30  $\mu\text{m}$  (Proxeon) interface. The Orbitrap resolution was set at 30,000. Peptides were detected in survey scans from 400 to 1600 amu (1  $\mu\text{scan}$ ), followed by fifteen data-dependent MS/MS scans (Top 15), using an isolation width of 2 u (in mass to-charge ratio units), normalized collision energy of 35%, and dynamic exclusion applied during 30 s periods.

Peptide identification from raw data was carried out using the SEQUEST algorithm (Proteome Discoverer 1.4, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). A database search was performed (UniProt-*Trypanosoma cruzi*\_CL Brener, Uniprot-Bos taurus y Uniprot-Chlorocebus sabaeus). The following constraints were used for the searches: tryptic cleavage after Arg and Lys, up to two missed cleavage sites and tolerances of 10 ppm for precursor ions and 0.8 Da for MS/MS fragment ions, and the searches were performed allowing optional Met oxidation and Cys carbamidomethylation. A search was performed against the decoy database (integrated decoy approach) using a false discovery rate (FDR) < 0.01 (Queiroz et al., 2016).

### **Bioinformatic Analyses**

Protein enrichments were classified according to Gene Ontology (GO) with the trytrip GO terms enrichment tool and searching for molecular function ontology using *T. cruzi* CL Brener strain as reference

organism and Bonferroni correction with a cut-off value of  $p \leq 0.01$  and represented as scatter plots and interactive graphs using REVIGO web tool (<http://revigo.irb.hr/>, accessed on 27 June 2017). The terms GO:0003674 “molecular function” and GO:0005198 “structural molecule activity” terms were not represented.

To generate a chromosomal distribution of EVs’ TS groups we followed the methodology described by Freitas et al. (2011) (L. M. Freitas et al., 2011). Briefly, the chromosomal coordinates of the TS genes were retrieved using *T. cruzi* CL-Brener genome from TriTrypDB (<http://TriTrypDB.org>, accessed on 27 June 2017) and plotted on the chromosomes.

For each protein, the probability of appearing in a given proteome sample type was estimated by dividing the number of samples in which the protein was found by the total number of samples of that proteome sample type. To show the level of precision in the estimate, we accompanied these values with confidence intervals. In particular, we calculated the modified Wilson confidence interval for a binomial proportion using the BinomCI function from the R DescTools package. Violin plots were generated using the ggplot2 package.

### **Production of Polyclonal Anti-*T. cruzi* Antibodies**

Five male BALB/c mice were immunized with 20  $\mu\text{g}$  of a total extract of purified trypomastigotes of the *T. cruzi* Pan4 strain to produce an anti-*T. cruzi* antibody. A suspension of the antigen was prepared by dilution of the lysed parasites in PSB plus Freund’s adjuvant (Sigma, Ronkonkoma, NY, USA), in a 1:1 ratio (final volume: 500  $\mu\text{L}$ ). This suspension was administered intraperitoneally to mice and, for subsequent immunizations, the adjuvant was then switched to

incomplete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A total of 7 immunizations (1 per week) were performed and the animals were exsanguinated two weeks after the final immunization. The antibody production was evaluated using ELISA and Western blot (WB), as previously described (De Pablos et al., 2011; Retana Moreira et al., 2019).

### **Western Blotting**

To confirm the presence of specific proteins in EVs of TCT and EVs of E identified in the proteomic analysis, Western blots using anti-cruzipain and anti-trans-sialidase (mAb39) antibodies (as described by Retana Moreira et al. in 2019) (Retana Moreira et al., 2019) and the anti-*T. cruzi* antibody obtained after the immunization of mice (described in the previous section) were performed. For each WB, 30 µg of EVs of TCT or E were resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and blocked overnight with 5% non-fat milk in PBS-0.1% Tween 20. The membranes were then washed in PBS-0.1% Tween 20 and incubated overnight at 4°C with different primary antibodies: anti-cruzipain (1:1000) (produced in rabbit), anti-TS mAb 39 (1:1000) (produced in mice) and anti-*T. cruzi* (1:100) (produced in mice). After incubation, the membranes were washed again in PBS-0.1% Tween 20 and incubated for 1 h with goat anti-rabbit IgGs conjugated with peroxidase (1:2000) in the case of cruzipain (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and goat anti-mouse IgGs conjugated with peroxidase (1:1000) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) in the case of TS and anti-*T. cruzi*. The reaction was visualized using Clarity ECL Western substrate (BioRad, Hercules,

CA, USA) in a ChemiDoc Imaging System (BioRad, Hercules, CA, USA).

### **Measurement of Zeta-potential of EVs**

To determine the zeta-potential of EVs of *T. cruzi*, samples of EVs of TCT and EVs of E, as well as samples of EVs treated as described in Section 4.4, were resuspended in phosphate buffer (PB) 7.4, 1.13 mM, 10 mM NaCl solution and the electrophoretic mobility ( $\mu\text{e}$ ) was measured by Laser Doppler electrophoresis, in a Zetasizer NanoZeta ZS (Malvern Panalytical, Worcestershire, UK), at 25°C. ZP was calculated by using the Smoluchowski equation and results were obtained from at least three

### **Atomic Force Microscopy**

#### **Topographic Measurements and Imaging**

To investigate the morphology of EVs of TCT and EVs of E, non-contact mode AFM imaging was performed using an NX-20 instrument (Park Systems, Suwon, Korea) and ACTA cantilevers ( $K = 40 \text{ N m}^{-1}$  and  $f = 320 \text{ kHz}$ ). Each sample was diluted 1:4 in sterile- filtered PBS to obtain a concentration of  $1.55 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A volume of  $8 \mu\text{L}$  of the dilution of EVs was deposited onto freshly cleaved muscovite mica, the most common substrate for single-molecule imaging of DNA and proteins and also considered the first choice for AFM imaging of extracellular vesicles (Pariisse et al., 2017). The samples were deposited on the substrate for 10–15 min and they were rinsed three times with MilliQ water (Millipore, Burlington, MA, USA) to remove salts and loosely bound EVs. Finally, the samples over the mica substrates were further dried before imaging with a gentle stream of

argon. Images were typically acquired as 256 x 256 pixels at a scan rate of 0.5–0.7 Hz. Subsequently, images were processed and analyzed using XEI software (Park Systems, Suwon, Korea). Representative images of samples were obtained by scanning at least 3 different locations on at least 3 different samples of the same nature.

### **Force Spectroscopy**

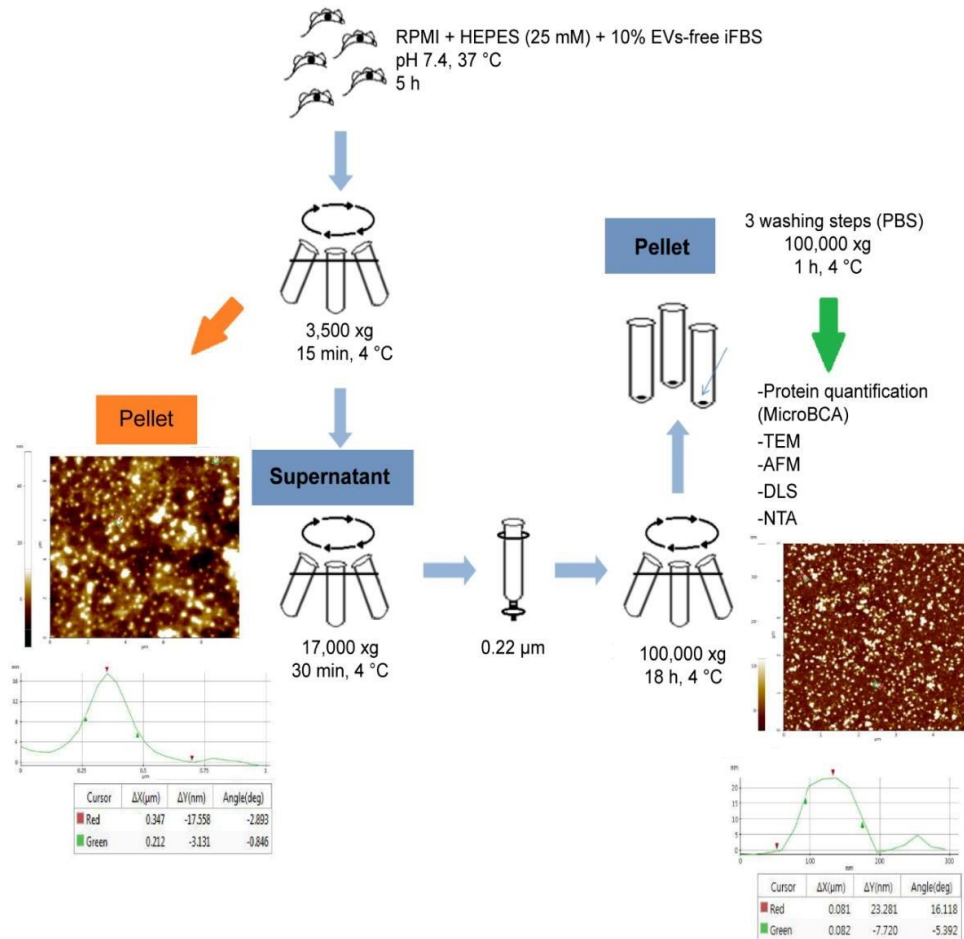
For the determination of the nanomechanical properties of EVs of each stage of the parasite, the samples were diluted 1:100 in PBS and deposited onto freshly cleaved muscovite mica sheets for 10 min. After the adsorption process, mica sheets were then rinsed with deionized water and dried under a gentle stream of argon, as described previously. In this case, NSC-14 probes were used ( $K = 5 \text{ N m}^{-1}$  and  $f = 160 \text{ kHz}$ ) and measurements were performed using the gentle PinPoint mode to acquire reproducible and reliable topography, stiffness, adhesion and elastic module maps. The measurement procedure could be explained in 3 steps: (1) the XY scanner stops during acquisition; (2) the tip approaches the surface, measures mechanical properties and retracts from the surface over a few ms (4 ms) to achieve an interaction force preset (15 nN) and (3) records the approach height maintaining the Z distance. With this procedure, the force is held constant while properties are measured, then the tip is retracted and moved to the next pixel (Supplementary Materials and Figure S6).

### **Conclusions**

This work clearly shows that the developmental differentiation from E to eventual TCT will impact properties of EVs at different levels: protein composition, biophysical parameters (adhesion, Young

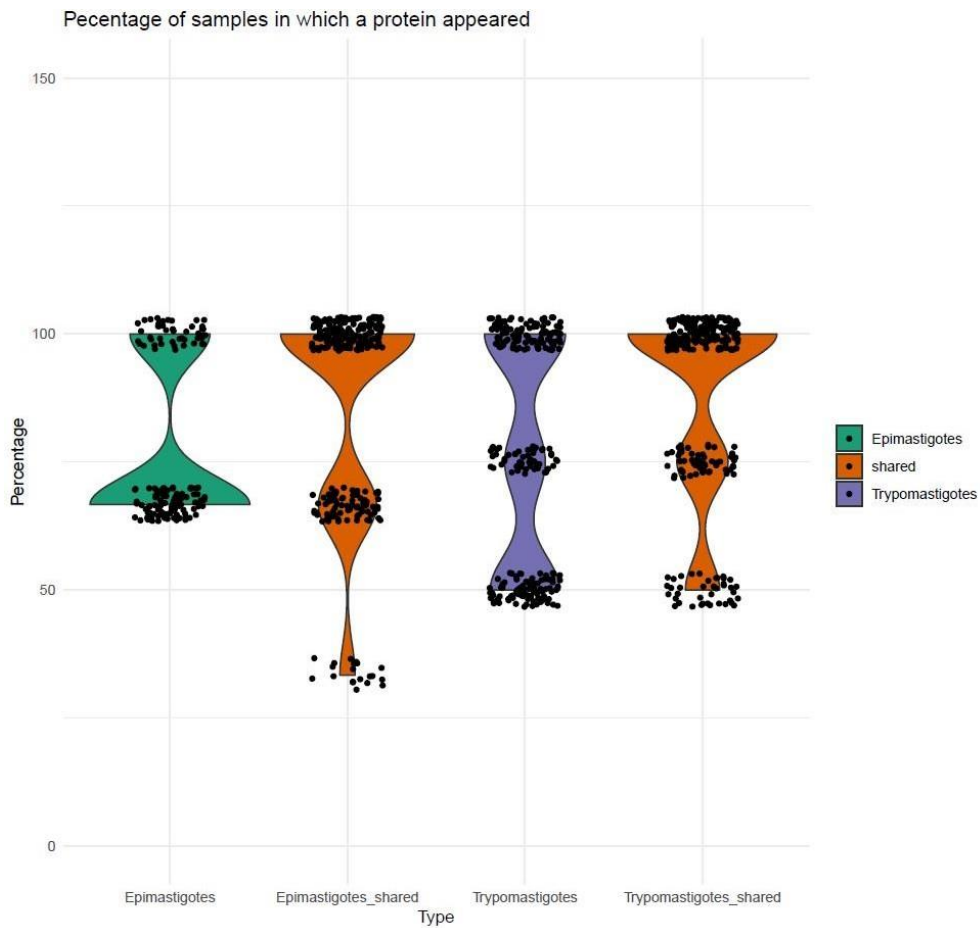
modulus and stiffness) and the surface electric charge. The differences observed suggest that EVs of TCT are more prone to withstand changes in length when under lengthwise tension or compression with a polymorphic glycoprotein surface, a reflection of the high variety of environments faced by trypomastigotes in the mammalian hosts, increasing its chances for survival.

## Supplementary Materials

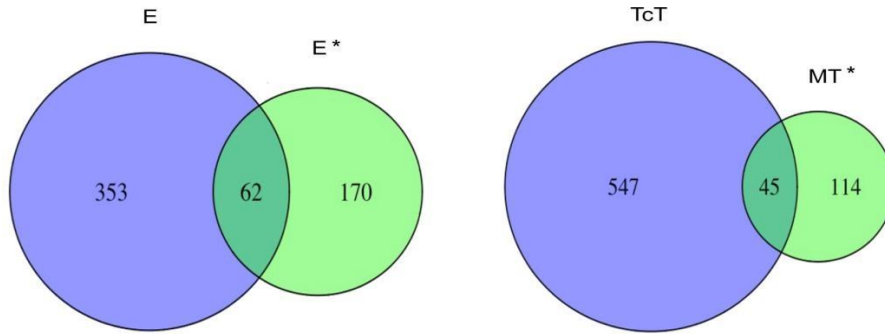


**Supplementary Figure 1.** Schematic representation of the isolation and purification of EVs of *T. cruzi* Pan4 strain.

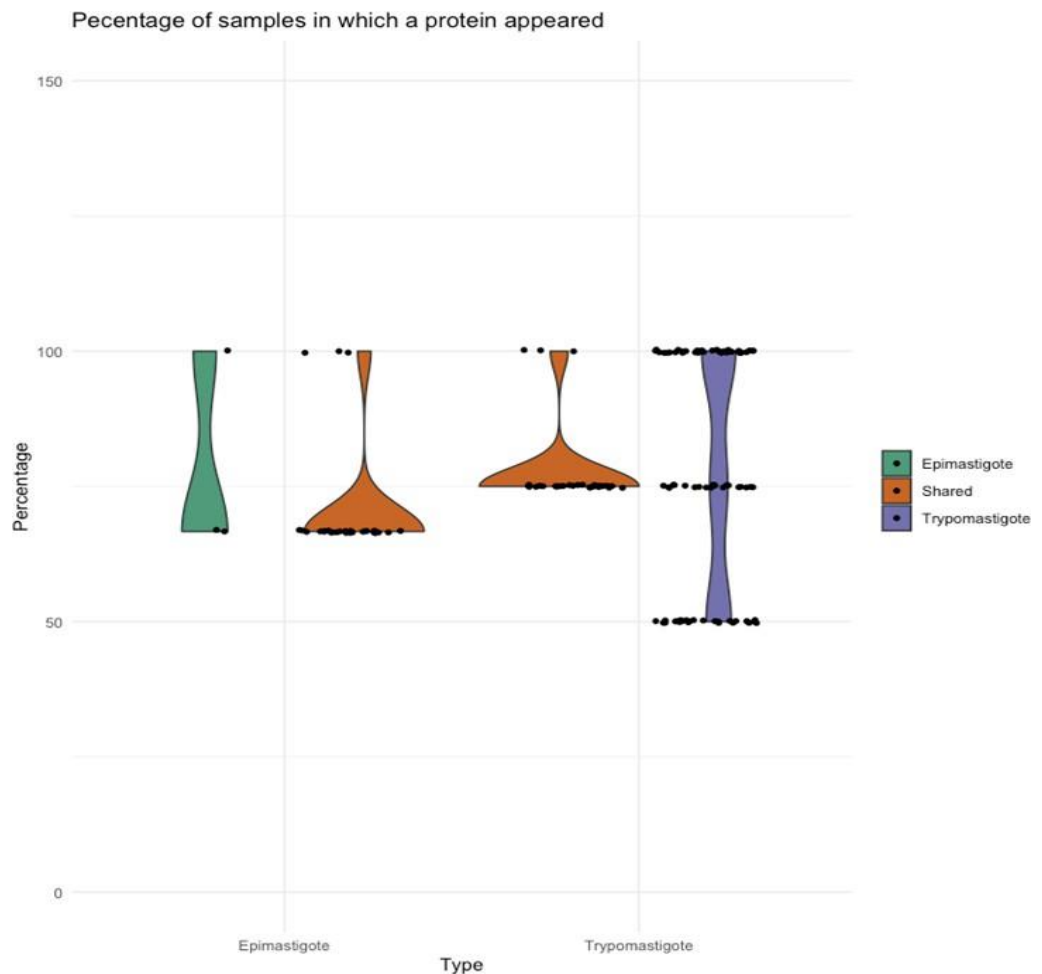




**Supplementary Figure 2.** Protein richness and frequency in EVs of *T. cruzi*. Violin plot showing the probability density (percentage, y-axis) of proteins in EVs of E, EVs of TCT and proteins present in both types of samples (shared).



**Supplementary Figure 3.** Venn diagram for the comparison of the cargo of proteins of EVs of E and EVs of TcT of *T. cruzi* Pan4 strain employed in this study and the cargo of proteins of the EVs of E and MT stages isolated by Bayer Santos et al in 2013 (\*) (Bayer-Santos et al., 2013).



**Supplementary Figure S4.** Percentage of appearance of TS in EVs of *T. cruzi*: TS protein richness and appearance frequency. Violin plot showing the probability density (percentage, y-axis) of proteins in EVs of E, EVs of TCT and proteins present in both types of samples (shared).

## Supplementary Methods

### AFM Principle

The probe used in AFM is a cantilever (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) with a very sharp tip to scan the sample's surface. The interaction between the tip and surface is the reference for scans. When the tip approaches the surface, the attractive force between the surface and the tip causes the cantilever's deflection. However, if the cantilever is brought closer to the surface, such that the tip makes contact with it, repulsive forces increase and cause the cantilever to deflect away from the surface.

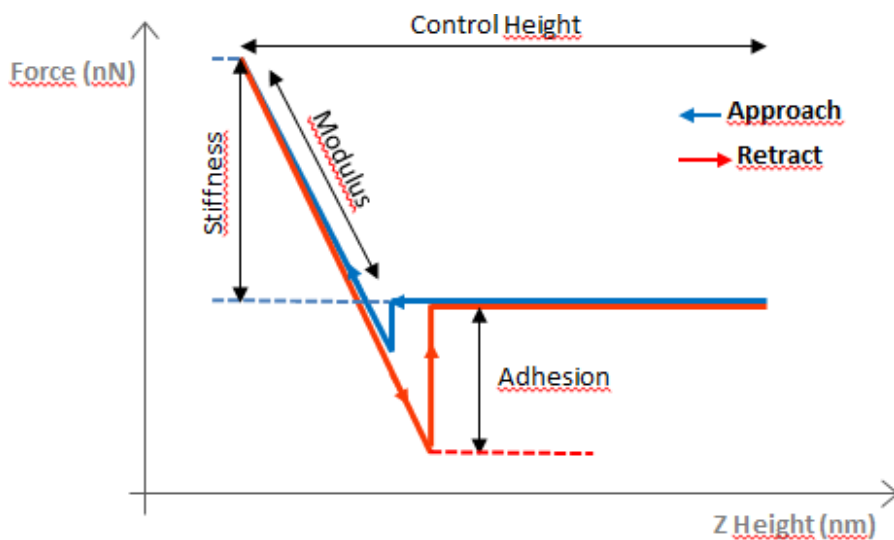
A laser beam is focused on the cantilever in such way that cantilever's deflections are registered when the laser is moved from the middle position of the sensitive photodiode (PSPD). When the AFM tip sweeps the sample's surface, it finds peaks and valleys that generate changes in the cantilever's deflection and those movements are recorded in the PSPD.

AFM generates topographic maps of surface features using a feedback system that controls the height of the tip above the surface pixel by pixel and with subnanometric precision.

### Structural and mechanical characterization of EVs

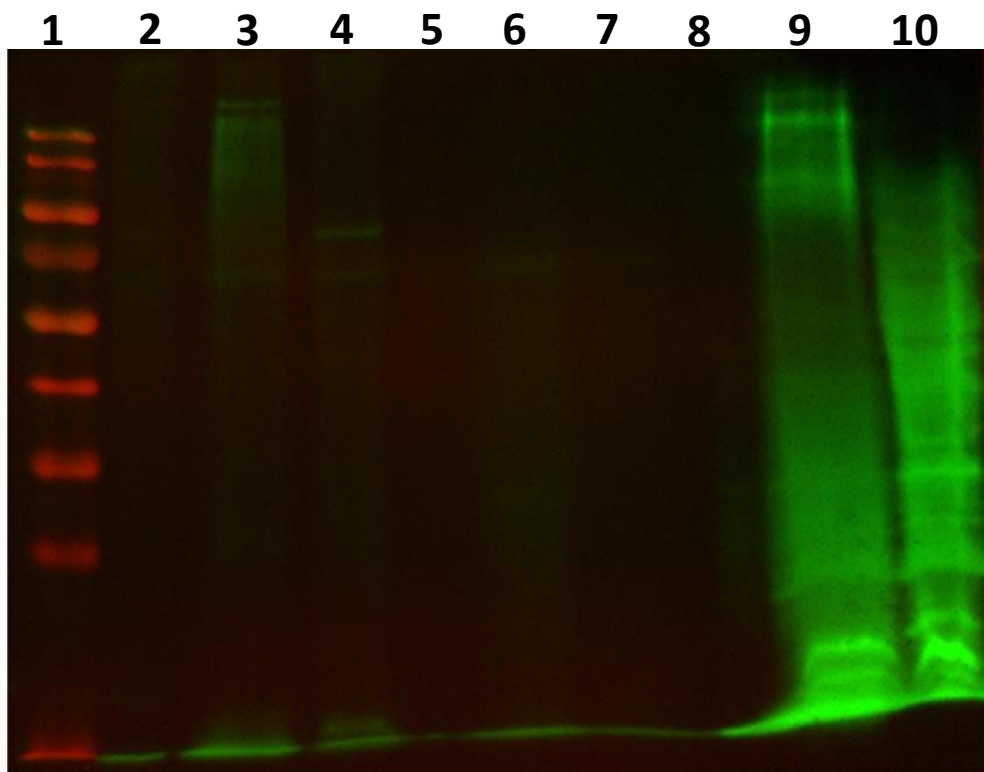
The structural and mechanical characterization using AFM has been reported based on the study of F-D curves as an output signal to

extract quantitative results for several parameters such as elastic modulus, stiffness and adhesion according to Figure 6. F-D curves were sampled at 50 kHz. The elastic modulus is the ability of a material to resist being deformed elastically (returning to its original length) when stress (force) is applied and it is defined as the slope of its stress-strain curve (F-D curve), in the elastic deformation region. Stiffness is the measure of resistance to deformation in response to an applied force and adhesion is the tendency of surfaces to cling to one another.

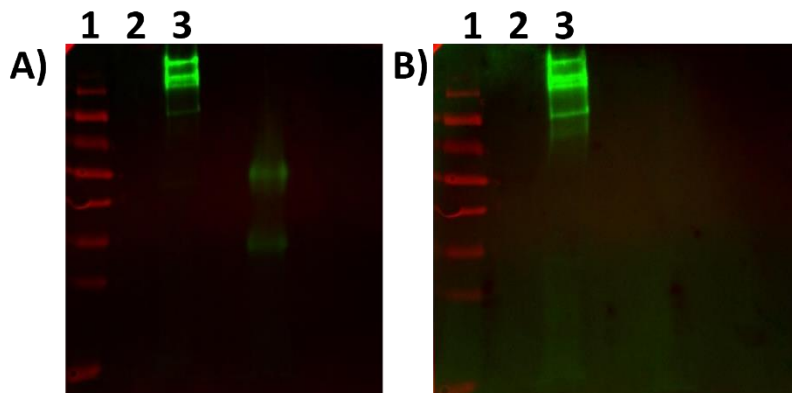


**Supplementary Figure S5.** F-D curve and parameters for nanomechanical properties.

**Original blots and gels**

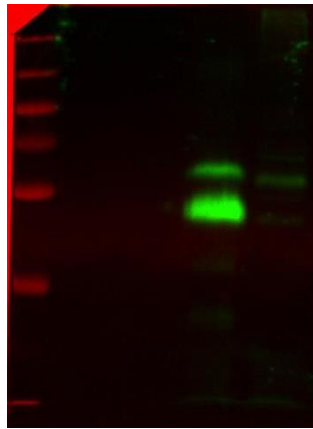


**Supplementary Figure S6.** Western blot and differential protein profile of E and TCT using polyclonal anti-*T. cruzi* polyclonal antibodies. Lane 1: molecular weight marker; lane 9: whole lysates of TCT; lane 10: wholelysates of E.

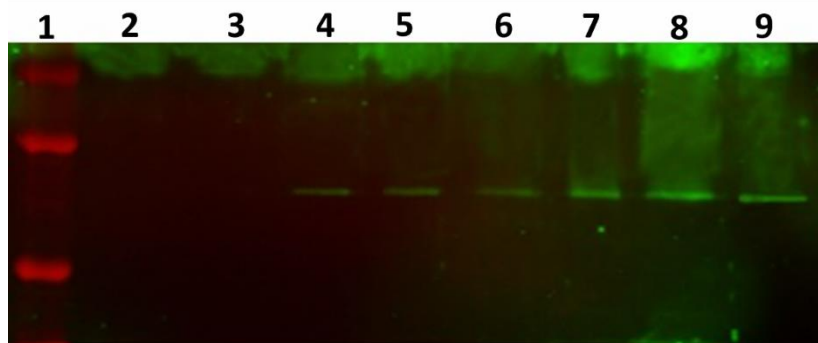


**Supplementary Figure S7.** *Trans*-sialidase (mAb 39) in whole lysates of TCT (A, lane 3) and *trans*- sialidase (mAb 39) in EVs of TCT (B, lane 3).

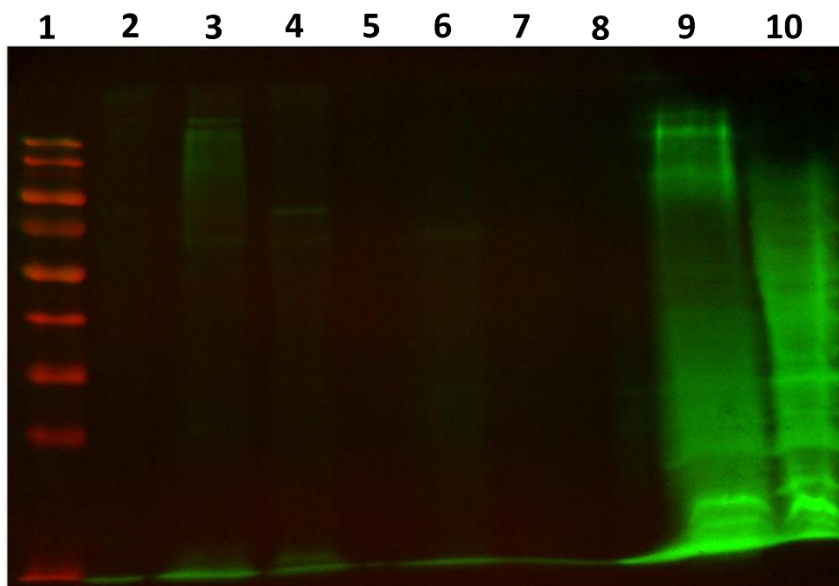
1 2 3 4 5



**Supplementary Figure S8.** Cruzipain in whole lysates of TCT (lane 4) and Cruzipain in EVs of TCT (lane 5).



**Supplementary Figure S9.** PHB2 in EVs of E (lanes 4 and 5) and PHB2 in whole lysates (Lines 6-9).



**Supplementary Figure S10.** Western blot of EVs of E and EVs of TCT treated/untreated with proteinase K and incubated with anti-TS antibodies. Lane 1: molecular weight marker; lane 2: treated EVs of TCT; lane 3: untreated EVs of TCT; lane 4: untreated EVs of E; lane 5: treated EVs of E; lane 9: whole lysates of TCT; Lane 10: wholelysates of E

# 5. Capítulo 2

**Extracellular vesicles of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce changes in ubiquitin-related processes, cell-signalling pathways and apoptosis**

Scientific Reports. 2023. 13, 7618

<https://doi.org/10.1038/s41598-023-34820-6>

Cuartil: Q1

Índice de impacto: 4,9





## **Extracellular vesicles of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* induce changes in ubiquitin-related processes, cell-signaling pathways and apoptosis**

Alberto Cornet-Gomez<sup>1\*</sup>, Lissette Retana Moreira<sup>1,2,3\*</sup>, Thales Kronenberger<sup>4,5</sup>, Antonio Osuna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular (CTS 183), Departamento de Parasitología, Campus de Fuentenueva, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica

<sup>4</sup>Institute of Pharmacy, Pharmaceutical/Medicinal Chemistry and Tübingen Center for Academic Drug Discovery (TüCAD2), Eberhard Karls University Tübingen, Auf der Morgenstelle 8, 72076 Tübingen, Germany

<sup>5</sup>School of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland, Kuopio 70211, Finland

\*These authors contributed equally to this work

Corresponding author: aosuna@ugr.es

## Abstract

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The disease has an acute and a chronic phase in which approximately 30% of the chronic patients suffer from heart disease and/or gastrointestinal symptoms. The pathogenesis of the disease is multifactorial and involves the virulence of the strains, immunological factors and ~~perhaps~~ the extracellular vesicles (EV) shed by the parasite which participate in cell-cell communication, and evasion of the immune response. We present a transcriptomic analysis of cells stimulated with EV of the trypomastigote stage of *T.cruzi*. Results after EV-cell incubation revealed 322 differentially expressed genes (168 were upregulated and 154 were downregulated). In this regard, the overexpression of genes related to ubiquitin-related processes (*UBE2C*, *SUMO1* and *SUMO2*) is highlighted. Moreover, the expression of Rho-GTPases (*RhoA*, *Rac1* and *Cdc42*) after the interaction was analyzed, revealing a downregulation of the analyzed genes after 4 hours of interaction. Finally, a protective role of EV over apoptosis is suggested, as relative values of cells in early and late apoptosis were significantly lower in EV-treated cells, which also showed increased CSNK1G1 expression. These results contribute to a better understanding of the EV-cell interaction and support the role of EV as virulence factors.

## Introduction

*Trypanosoma cruzi* is an intracellular protozoan parasite, the etiologic agent of American trypanosomiasis or Chagas disease. The World Health Organization (WHO) estimates 6-7 million people to be infected and approximately 75 million people are at risk of infection with this parasite worldwide. Chagas disease is endemic in Latin America due to the presence of blood-sucking triatomine bugs (Hemiptera, Reduviidae) that transmit the parasite to vertebrate hosts (WHO, 2021). However, the infection can also occur through blood transfusions and organ transplantation, through vertical transmission and after consumption of food/drinks contaminated with the excreta/feces of infected triatomines. Nowadays, Chagas disease has a global expansion due to human displacements, emerging in areas of the United States, Canada, Europe, Australia and Japan, considered disease-free a few decades ago (WHO, 2015). Despite its prevalence and severity, there is neither a truly specific treatment for the chronic phase nor effective prophylaxis for this disease (Pecoul et al., 2016).

*T. cruzi* presents a complex life cycle that includes hematophagous reduviid bugs (invertebrate hosts) and mammalian vertebrate hosts. The life cycle starts when the insect takes a blood meal from a vertebrate host that contains the blood trypomastigote stage of the parasite. These forms migrate to the midgut of the insect and differentiate into epimastigotes, a highly replicative stage inside the invertebrate host. After 8-15 days after the blood ingestion, some of these

epimastigotes will transform in the final part of the insect's intestine and rectal ampulla into non-proliferative, metacyclic trypomastigotes. Parasites will be released with its feces when feeding on a vertebrate host. Metacyclic trypomastigotes could gain access to the vertebrate host by skin discontinuities and invade a wide variety of nucleated cells. Inside the cells, these forms differentiate into amastigotes, the replicative stage of the parasite inside the vertebrate host, and after 96-120 h (and several rounds of multiplication), amastigotes will differentiate into trypomastigotes and lyse the cells. After reaching the bloodstream (Tyler & Engman, 2001), trypomastigotes will be able to infect other cells and are also available for their ingestion by other triatomines, thus completing their life cycle (Fernandes & Andrews, 2012).

Chagas disease displays symptomatic and pathological variations among the infected individuals. Moreover, the pathogenesis of the disease is considered a multifactorial process that involves many interactive pathways (Wyllie & Ramirez, 2017). In this sense, the molecular invasion mechanisms by trypomastigotes of *T. cruzi* and the associated regulatory pathways have been intensely investigated for many years (Machado et al., 2012). A large number of secreted molecules have been suggested to be involved in host cell invasion mechanisms, and some of them have been described to be associated with extracellular vesicles 8,9.

Extracellular vesicles (EV) are small membrane-bound vesicles released to the extracellular milieu by almost any type of cell and can be classified based on their size, biogenesis and composition; this classification includes: a) exosomes (20–100 nm), b) ectosomes (100–1000 nm) and c) apoptotic blebs (>1000 nm), among others (Bayer-Santos et al., 2013; van der Pol et al., 2012). EV composition is complex and proteins, lipids, nucleic acids (DNA and RNA) and/or active metabolites are part of the EV cargo (Bayer-Santos et al., 2013; de Pablos Torró et al., 2018; Marcilla et al., 2014; van der Pol et al., 2012). The secretion of EV by *T. cruzi* was first demonstrated by da Silveira et al in 1979 (Da Silveira et al., 1979); since then, several research groups have been studying the role of EV in the pathogenesis of Chagas disease, demonstrating significant effects mainly in cell-cell communications, cell infection and evasion of the immune response 9,11,14-16.

EVs secreted by different stages of *T. cruzi* contain several surface components that are involved in the adhesion, invasion and even migration of epimastigote forms as the parasite migrates along the vector's gut (Cronemberger-Andrade et al., 2020; Nogueira et al., 2015; Paranaíba et al., 2019; Retana Moreira et al., 2021; Ribeiro et al., 2018).

Previous studies performed by our research group have also demonstrated the role of EV of trypomastigotes in generating changes in cell physiology, such as cell membrane permeability, increases in intracellular free calcium concentrations, disruption

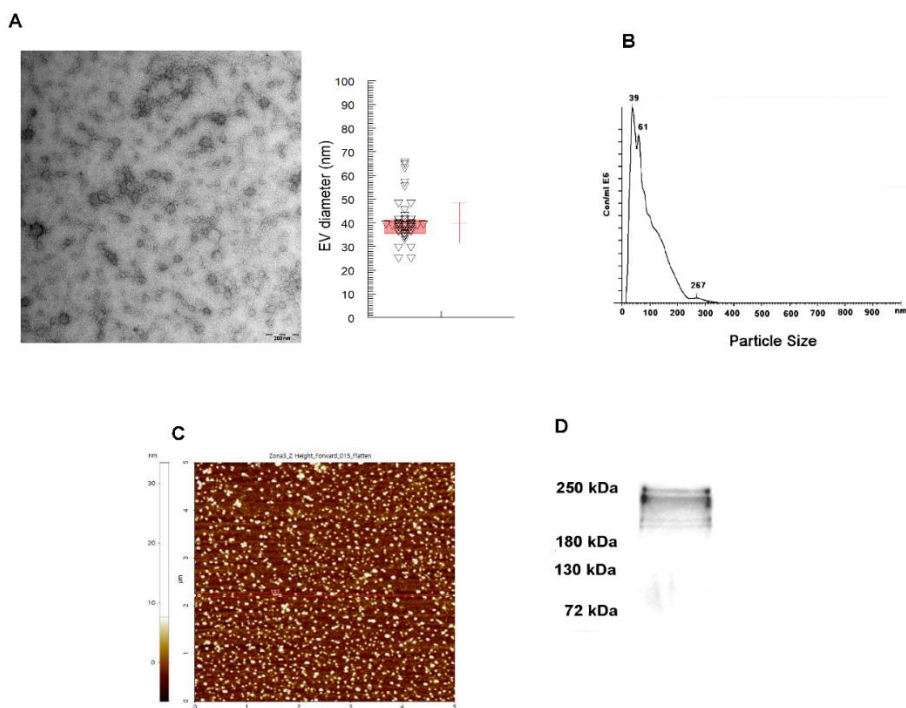
of the cytoskeleton or cell cycle functionality which facilitate cell parasitization (Retana Moreira et al., 2019; Trocoli Torrecilhas et al., 2009). Nowadays, there are many descriptions of the effects of EV on *T. cruzi* over host cells, and big data analyses such as RNA analysis, proteomics and transcriptomics can help explain these changes at molecular scale.

In order to delve into the effects of EV over cells at transcriptome level, we present a transcriptomic analysis of Vero cells stimulated with EV secreted by the trypomastigote stage of *T. cruzi* (the infective stage of the parasite to the vertebrate host) and reveal the differential expression of genes after the stimulation. The results obtained ~~would~~ contribute to a better understanding of the interaction between EV of the parasite and uninfected host cells in order to prepare these cells for invasion and/or modulate the host's responses to *T. cruzi*. Knowledge concerning the pathogenic processes and virulence factors secreted by the parasite is needed for the design of prophylactic and therapeutic approaches for Chagas disease.

## Results

**Isolation and characterization of extracellular vesicles of trypomastigotes of *T. cruzi*.** A protocol that includes differential centrifugation, coupled with a filtration process through 0.22 µm pore filters and ultracentrifugation, was employed for the isolation of EV of trypomastigotes of *T. cruzi* Pan4 strain. The success of this protocol was evaluated using transmission

electron microscopy, atomic force microscopy and nanoparticle tracking analysis. Nanoparticle tracking analysis revealed EV with a mean size of  $94 \text{ nm} \pm 57 \text{ nm}$  and a mode of  $39 \text{ nm}$ , results that coincide with the reported size of EV secreted by trypomastigotes of *T. cruzi* previously described by our group 14. Western blot confirmed the presence of *trans*-sialidase in EV of this stage of the parasite. Results of the characterization analyses of the EV of trypomastigotes are summarized in Figure 1.



**Figure 1.** Isolation of extracellular vesicles of trypomastigotes of *T. cruzi* Pan4 strain: **A)** transmission electron microscopy image of EV (scale bar: 200 nm, mean size: 39.9 nm, mode: 38.8 nm); **B)** nanoparticle tracking analysis size distribution of EV (mean size:  $94 \text{ nm} \pm 57 \text{ nm}$ , the largest peak of number of particles corresponding to a size of 39 nm); **C)** atomic force microscopy image



of EV and, **D**) Western blot analysis for the confirmation of *trans*-sialidase in EV of trypomastigotes.

### **Effect of EV of trypomastigotes of *T. cruzi* over Vero cell cultures**

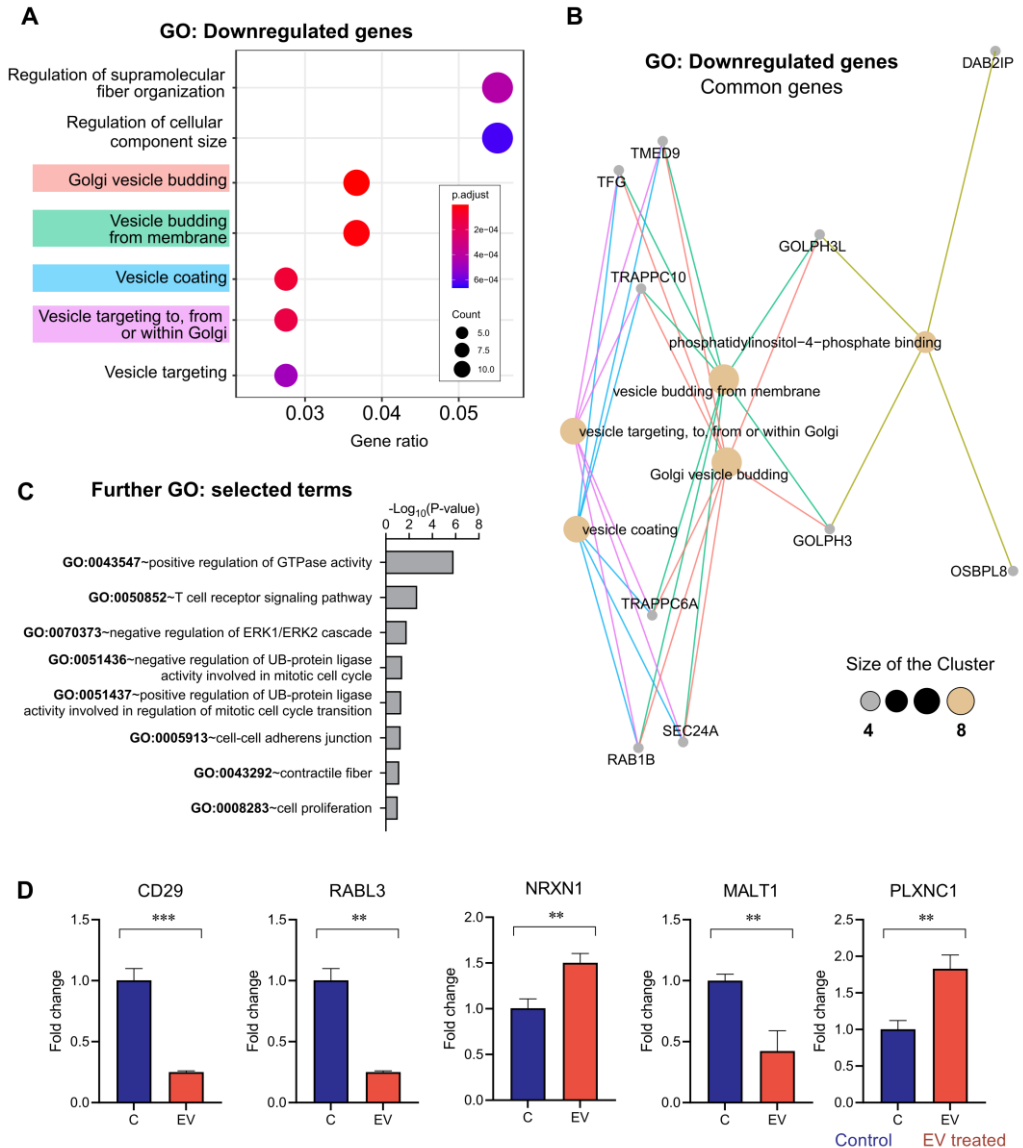
Results from the transcriptome analysis revealed 322 differentially expressed genes (DEGs); among those, 168 genes were upregulated (52%, LogFC>2) and 154 genes were downregulated (47.6%, <-2) in cells incubated with EV of the parasite. Representative transcripts with the highest fold change differences are displayed in Table 1.

Accession number	Gene ID	CC	CEV	LogFC	Prob	Biotype	Name
NR_122069	HOXA-AS2	18.83	0.50	5.23	0.98	lncRNA	HOXA cluster antisense RNA 2
XM_024451477	CCDC106	17.65	0.50	5.14	0.98	protein_coding	Coiled-coil domain containing 106 (CCDC106)
NM_001330096	NRXN1	16.48	0.50	5.04	0.98	protein_coding	neurexin 1
XM_017011231	TCP10	16.48	0.50	5.04	0.98	protein_coding	t-complex 10
XR_929124	LOC105375935	14.12	0.50	4.82	0.97	lncRNA	uncharacterized LOC105375935
NR_104037	UBE2C	23.54	0.87	4.76	0.99	protein_coding	ubiquitin conjugating enzyme E2 C
NM_001014985	GLTPD2	12.94	0.50	4.69	0.97	protein_coding	glycolipid transfer protein domain containing 2
NM_007200	AKAP13	12.94	0.50	4.69	0.97	protein_coding	A-kinase anchoring protein 13
NM_015055	SWAP70	12.94	0.50	4.69	0.97	protein_coding	switching B cell complex subunit SWAP70
NR_123740	RIMKLB	12.94	0.50	4.69	0.97	protein_coding	ribosomal modification protein rimK like family member B
NM_024093	C2orf49	0.50	13.90	-4.80	0.97	protein_coding	chromosome 2 open reading frame 49
XR_002956178	PARP8	0.50	13.90	-4.80	0.97	protein_coding	poly(ADP-ribose) polymerase family member 8
NM_207404	ZNF662	0.50	14.77	-4.88	0.97	protein_coding	zinc finger protein 662
NM_001184763	UHMK1	0.50	15.6	-4.97	0.98	protein_coding	U2AF homology motif kinase 1
XR_946261	LOC101927445	0.50	15.6	-4.97	0.98	lncRNA	uncharacterized LOC101927445

**Table 1.** Differentially regulated transcripts (identified by their accession numbers and gene names IDs) with the highest fold change (LogFC) from the comparison of cells incubated with EV of trypomastigotes of *T. cruzi* (CEV) to control cells (CC).

Initial enrichment representation analyses were performed using the set of highly modulated DEGs (separating upregulated and downregulated list of genes), against the GO/KEGG databases by DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)) and ClusterProfiler, as well as publicly available gene sets. Most of the detected GO terms and KEGG pathways displayed relevant *p*-values but failed to pass an acceptable FDR cut-off, likely due to the small sample size (Table S1).

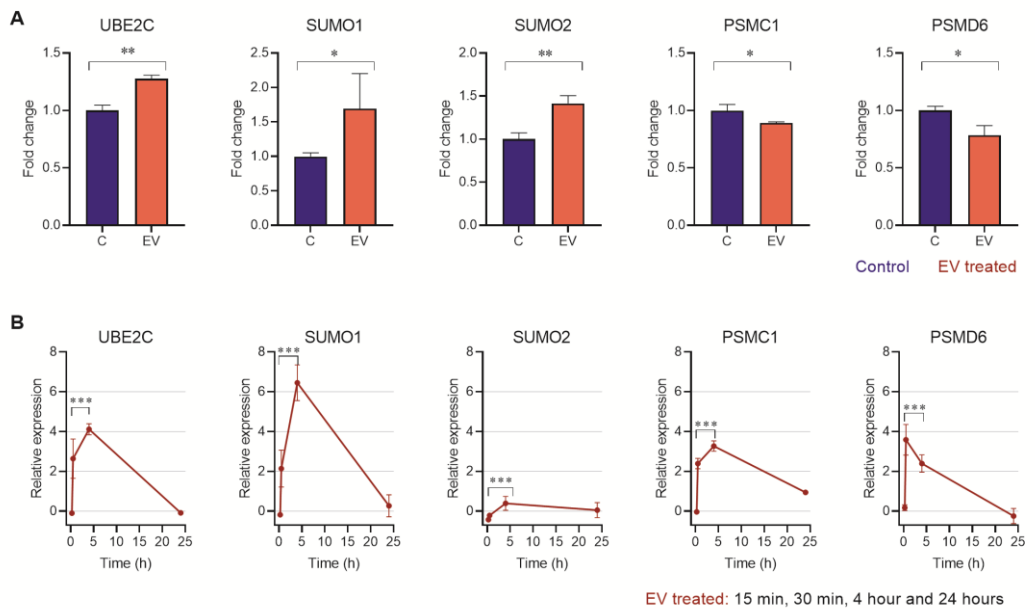
In terms of gene ontology (GO), a large enrichment of terms related to vesicle forming/processing biological processes was observed among the downregulated transcripts (*p*-value  $\leq 0.01$ , Figure 2A). These GO processes can, however, be summarized by the downregulation of a few common genes (Figure 2B), such as *TrappC6A* (LogFC= -3.26), *TrappC10* (LogFC= -4.60), *TMED9* (LogFC= -3.47), *TFG* (LogFC= -4.11) and *Rab1b* (LogFC= -2.05), as well as *Sec24A* (LogFC= 2.76), which showed only a marginal modulation when re-validated using RT-qPCR.



**Figure 2.** Transcriptomics analysis of cells incubated with extracellular vesicles of trypomastigotes of *T. cruzi*. Enrichment analyses suggest that EV of trypomastigotes downregulate genes that belong to processes related to vesicle formation, deubiquitylation/SUMOylation, as well as cell cycle control. **A)** Top-ranked GO processes detected by enrichment analyses on downregulated DEGs, followed by a topological representation of the common genes in the top four ranked processes (**B**), as determined by ClusterProfiler.

**C)** Selected GO processes detected by enrichment analyses using the highly modulated DEGs, as determined against the DAVID database and **(D)** respective relevant genes validated by RT-qPCR. Gene expression was calculated as fold induction caused by the respective treatment/control as compared with the expression of GAPDH. Data are presented as shown above, with mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Differences to this value were analyzed by one sample Tukey multiple comparison test signed rank tests (asterisks), where \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

GO terms such as T-cell receptor signaling pathway and ubiquitin/SUMO appeared as relevant among the downregulated pathways, which not only agree with gene set enrichment analyses (Figure S1A,B), but also contain some of the lowest ranked DEGs in terms of expression levels. Ubiquitin-related processes represented by the ubiquitin ligase components *UBE2C* (LogFC= 4.76), as well as supporting genes such as *SUMO1* and *SUMO2*, were shown to be upregulated in the RT-qPCR validation (Figure 3), while other components such as *Uba52* (LogFC= -3.15), *PSMD6* (LogFC= -3.26) and *PSMC1* (LogFC= -4.32) were downregulated.

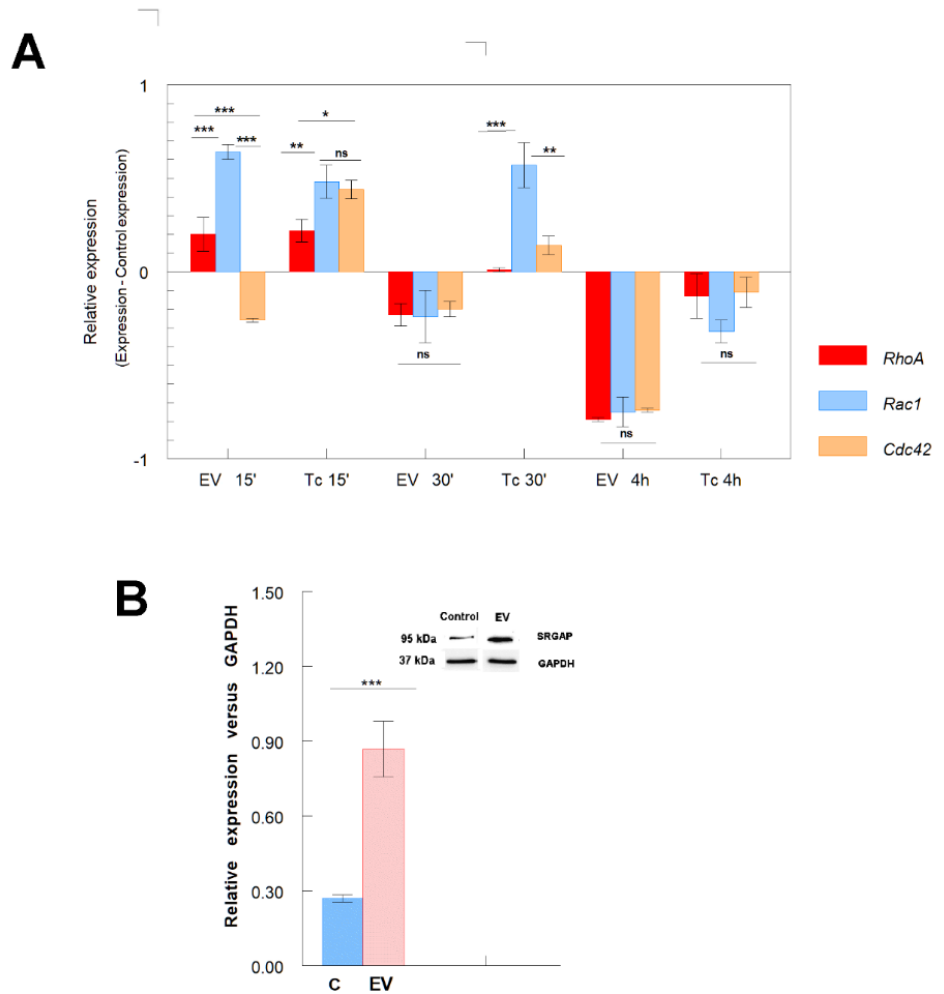


**Figure 3.** Expression analysis of genes involved in SUMOylation in Vero cells incubated with extracellular vesicles for 4 h **(A)** and cell cultures of Vero cells incubated with cell derived trypomastigotes of *T. cruzi* at different times during the process of infection **(B)**. Gene expression was calculated as fold induction caused by the respective treatment/control as compared with the expression of GAPDH. Data are presented as shown above, with mean  $\pm$  S.D. ( $n = 3$ ). Differences to this value were analyzed by one sample Tukey multiple comparison test signed rank tests (asterisks), where  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ .

In Figure 3A, an overexpression of *UBE2C*, *SUMO1* and *SUMO2* in cells incubated with EVs of trypomastigotes is observed, which coincides with expression results of cells incubated with trypomastigotes for the same time-point (Figure 3B). Figure 3B also shows the result of a control experiment where the expression levels of *SUMO1*, *SUMO2*, *UBE2C*, *PSMC1* and *PSMD6* genes analyzed by RT-qPCR in cells undergoing parasitization by the infective trypomastigote stage of the

parasite. In this case, a downregulation in the expression of *SUMO1*, *SUMO2*, *UBE2C* and *PSMC1* was observed 15 min post-infection when compared to the expression levels of the uninfected control cells. Subsequently, after 30 min of incubation, all genes except for *SUMO2* were upregulated. The same phenomenon was observed 4 h post-infection, including at that time-point the increased expression of *SUMO2*. However, expression levels of all genes decreased 24 h post-infection.

*Expression of RhoA, Rac1 and Cdc 42.* Figure 4 shows the expression of *RhoA*, *Rac1* and *Cdc42* after the incubation of cells with EV trypomastigotes of *T. cruzi*. In this figure, an overexpression of *RhoA* and *Rac1* is observed after 15 min of incubation, while the expression of *Cdc42* is downregulated. After this time-point, a downregulation in the expression of the 3 genes appeared at 30 min, being more evident at 4 h of the EV-cells interaction (Figure 4). Moreover, the incubation of trypomastigotes of the parasite with cells showed overexpression of the 3 genes both 15 and 30 min post-incubation, while at 4 h the same behavior as EV in downregulating the expression of the 3 genes was observed 4 h post-infection.



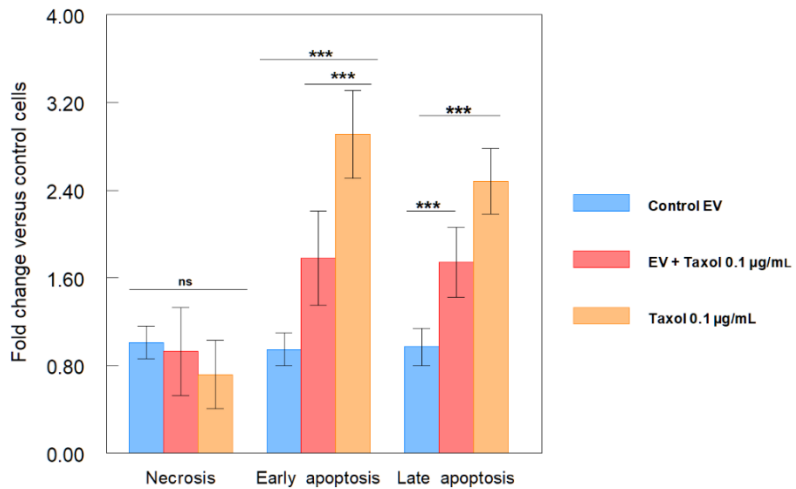
**Figure 4.** Changes in the expression of Rho-GTPase genes (*RhoA*, *Rac1* and *Cdc42*) induced by extracellular vesicles secreted by trypomastigotes of *T. cruzi*. **A)** An overexpression of *RhoA* and *Rac1* was observed 15 min post-incubation of Vero cells with EV, while the expression of *Cdc42* was downregulated. After this time point, a downregulation in the expression of the 3 analyzed genes appeared at 30 min, being more evident 4 h post-incubation. The incubation of cells with trypomastigotes revealed an overexpression of the 3 genes both 15 and 30 min post-infection, while the same behaviour of EV in downregulating the expression of the 3 genes was observed 24 h post-infection. **B)** Expression levels of SRGAP3, an activating



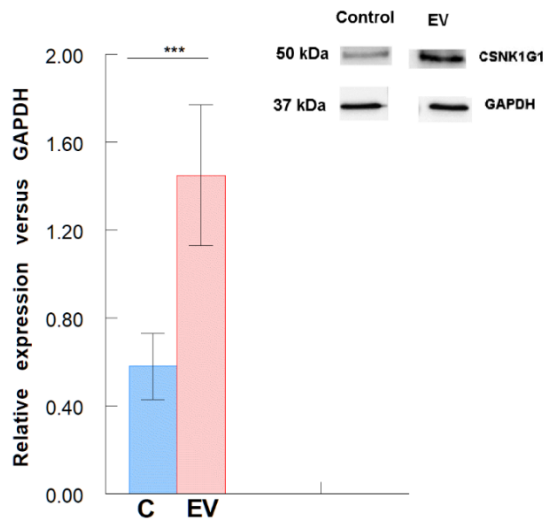
protein of Rho-GTPases, in cells incubated with EV of trypomastigotes of *T. cruzi* for 4 h. Gene expression was calculated as fold induction caused by the respective treatment/control as compared with the expression of GAPDH. Data are presented as shown above, with mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Differences to this value were analyzed by one sample Wilcoxon signed rank tests (asterisks), where \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

*Effect of EV of T. cruzi over apoptosis.* Flow cytometry was employed to evaluate if EV of trypomastigotes could have an effect on the apoptosis of Vero cells. As shown in Figure 5, relative values of cells in early and late apoptosis were significantly lower in cells incubated with EV of the parasite than in cells treated only with taxol (Figure 5A), which could suggest a “protective” role of EV against this type of cell death. Moreover, Western blot expression analysis of casein kinase protein CSNK1G1 revealed an increase in protein synthesis after the interaction of cells with EV of the parasite (Figure 5B).

**A**



**B**



**Figure 5.** “Protective” effect of extracellular vesicles of trypomastigotes of *T. cruzi* over apoptosis of Vero cells. **A)** Significant lower relative values of cells in early and late apoptosis were observed in cells incubated with EV and then treated with taxol for 72 h. The values are represented as the mean percentages  $\pm$  SEM. Tukey-Kramer test,  $p < 0.0001$ , ns: non-significant differences. **B)** Western blot analysis of casein kinase protein CSNK1G1 that

shows an increase in protein synthesis after the interaction of cells with EV of the parasite.

Gene expression was calculated as fold induction caused by the respective treatment/control as compared with the expression of *GAPDH*. Data are presented as shown above, with mean  $\pm$  S.D. (n = 3). Differences to this value were analyzed by one sample Wilcoxon signed rank tests (asterisks), where \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

## Discussion

Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* are one of the most studied vesicles in parasitology, and their roles in affecting cell physiology, functionality and the immune response have been confirmed. However, explanations for these roles at a molecular level are still scarce. To understand the influence of the vesicles of the parasite over cells at this level we performed transcriptome analyses, in which RNAs were obtained from Vero cells incubated for 4 h with EV of cell derived trypomastigotes and libraries were prepared and sequenced in a fraction of a NovaSeq6000 S4 flow cell (Illumina).

Sequencing results revealed that 322 genes were found to be differentially expressed genes (DEGs) in cells incubated with EV of the parasite: 168 genes were upregulated (52%, LogFC>2) and 154 genes were downregulated (47.6%, <-2). Among those with known functions, the upregulation of the long non-coding RNA of HOXA-AS2, whose shRNA was shown to act as an apoptosis repressor (H. Zhao et al., 2013) is highlighted and seems to be in accordance with results from the apoptosis assays, which will be discussed below. Moreover, this observation is in line with previous results from the group

(Retana Moreira et al., 2019) in which EV-treated cells were arrested in the G0/G1 cell cycle phase and other physiological alterations were reported, such as permeabilization of cell membranes and the disruption of actin filaments. In this sense, changes in the expression of *RhoA*, *Rac1* and *Cdc42*, Rho-GTPases involved in different cell responses and considered key regulators of the actin cytoskeleton were also observed in cells incubated with EV of the parasite, as well as an overexpression of SRGAP3, a protein that blocks the activity of Cdc42 (Wong et al., 2001). Altogether, these findings could explain, at least in part, some of the above-mentioned results, as well as previously published results (Retana Moreira et al., 2019) that motivated transcriptomics analysis included in this work.

On the other extreme, the downregulation of VPS8 expression (LogFC= -5.32) was identified, which, together with VPS3 (also known as TRAP1), is required for the recycling of  $\beta$ 1 integrins (Jonker et al., 2018; Lőrincz et al., 2019). Jonker et al. (2018) showed that the depletion of either VPS3 or VPS8 delays the delivery of internalised integrins to recycling endosomes and their return to the plasma membrane. This integrin recycling is fundamental for the interaction between the cell and the extracellular matrix as well as in invasion and migration (Nde et al., 2012).

The increased expression of both SUMO ligase and its substrates, together with the downregulation of ubiquitin cleaving proteins could be implicated in the deregulation in mitosis controlling proteins, as suggested by their respective GO terms

and by observations that SUMOylation/ubiquitylation deregulation leads to cell cycle arrest in mammalian lines, as well as cancer (Eifler & Vertegaal, 2015), depending on the cell type. SUMOylation is a key process in a number of cellular, nuclear, metabolic and immunological processes, and consists in a post-translational modification of proteins that regulates protein stabilization, nucleus-cytoplasmic transport and protein-protein interactions. More specifically, SUMOylation involves the modification of one or more lysine residues of target proteins by conjugation of a small ubiquitin-like polypeptide, known as SUMO, for degradation, stability, transcriptional regulation, cellular localization and transport (Singhal et al., 2022).

Deregulation in SUMOylation and deSUMOylation has been described in intracellular pathogens such as herpes simplex virus-1 (HSV-1) (Sloan et al., 2015) and influenza virus (types A and B; IAV and IBV) 29. In the case of HSV-1, a widespread reduction in the levels of cellular SUMOylated species induced by ubiquitin ligase ICP0 was reported; an activity that correlates with relief from intrinsic immunity antiviral defense mechanisms 28. For influenza, it was shown that the infection leads to a viral replication-dependent global increase in cellular SUMOylation (Domingues et al., 2015). More recently, a significant decrease in the expression of E3 SUMO ligase RanBP2 (Bojkova et al., 2020; C. Li et al., 2020) has been described in SARS CoV2-infected cells. Intracellular bacteria could also modulate the host SUMOylation machinery, so that intracellular development of the pathogen can take place, as is the case in *Shigella flexneri*

(Fritah et al., 2014) , *Salmonella typhimurium* (Mohapatra et al., 2018; Verma et al., 2015), *Yersinia* (Orth et al., 2000), among others.

In a similar way, it has been shown that the development and intracellular access of parasitic protozoa also modulates the SUMO machinery of the host cell. For example, sporozoites of *Plasmodium berghei* invading mammalian hepatocytes during their exaerythrocytic development can induce modifications in the expression of SUMOylation enzymes, which are significantly downregulated (Maruthi et al., 2017). An inhibition of host cell SUMOylation was also observed in cells during the process of *Toxoplasma gondii* infection (Maruthi et al., 2017). In trypanosomatids, it has been reported how the host SUMOylation pathway negatively regulates protective immune responses, which promotes the survival of *Leishmania donovani* (Singhal et al., 2022). Results from the study by Singhal et al. revealed that the infection of macrophages with the promastigote stage of this parasite leads to upregulation of SUMOylation pathway genes and downregulation of the SUMOylation gene *SENP1*, while infection with the amastigote stage leads to downregulation of proteins involved in SUMOylation (Singhal et al., 2022). In our experiments, *SUMO1* and *SUMO2*, as well as *UBE2C*, were upregulated in the transcriptome analysis of cells incubated with EV with respect to control cells, while a downregulation of *PSMD6* was observed in cells incubated with these vesicles. However, results from control experiments using trypomastigotes of *T. cruzi* revealed a substantial drop in the expression levels of *SUMO1*, *SUMO2*, *UBE2C* and *PSMC1* 15

min after the trypomastigote-cell interaction with respect to uninfected control cells, although *PSMD6* showed a slightly higher expression (Figure 3B). This specific time-point corresponds to the time when the parasite contacts the cell membranes to initiate the invasion process. Subsequently, at 30 min, the expression levels for all the analyzed genes involved in SUMOylation were upregulated (except for *SUMO2*), and the same phenomenon was observed 4 h after the infection. After 24 h of infection, the expression levels of *UBE2C* and *PSMD6* the expression levels returned to unstimulated baseline levels, while *SUMO1*, *SUMO2* and *PSMC1* showed slightly higher expression levels than uninfected control cells.

During the process of *T. cruzi* invasion of mammalian host cells, both cell culture-derived trypomastigotes ("blood" trypomastigotes and metacyclic trypomastigote forms) attach to the cell membrane using an array of different surface proteins. The parasite then invades the cell, leading to the formation of the parasitophorous vacuole to which the lysosomes fuse and both infecting forms induce similar cellular modifications including an increase in cytoplasmic calcium (Cardoso et al., 2016). Lysosomal acidification is an important signal for activating key mechanisms that allow the parasite escaping from the parasitophorous vacuole into the cytoplasm, where it differentiates into the replicative amastigote stage and multiplies actively (Agustin Cueto et al., 2018; Cardoso et al., 2016; Fernandes & Andrews, 2012). In contrast, promastigotes of *Leishmania* must be phagocytosed by neutrophils and

macrophages and establish an intracellular residence inside the phagolysosome, where they transform into amastigotes and multiply (Borghi et al., 2017). The mechanism of inhibition of the initial expression of SUMO proteins of the cell by trypomastigotes could be considered a survival mechanism while the parasite is located inside the parasitophorous vacuole prior to its escape to the cytosol. Although EV of the parasite are able to modify some physiological aspects of the host cell, modulation of the lysosomal response in the early stages of EV-cell interaction has not yet been demonstrated, contrary to what occurs after the parasite's entry, which would explain the differences in the SUMOylation of cells.

Changes in gene expression by the incubation of cells with EV of *T. cruzi* have been previously published by Garcia Silva et al. (2014), which employed a different cell line (HeLa), as well as EV secreted by the non-infective stage (epimastigotes) of the parasite for the vertebrate host, and a different strain of the parasite (DM28c) (Garcia-Silva, Cabrera-Cabrera, et al., 2014; Garcia-Silva, Cura das Neves, et al., 2014). In their studies, the authors revealed changes in the expression of different genes, and the elicited responses modified mainly the host cell cytoskeleton, the extracellular matrix and immune response pathways and described gene expression changes in *Rho-GTPases*, *IL-1*, *IL-1R*, *IL-6*, *IL-18*, among others (Garcia-Silva, Cabrera-Cabrera, et al., 2014). For these authors, some of the affected pathways were of particular interest in light of the infection-favoring role of EV of *T. cruzi*, such as the Rho-GTPase



signaling pathway that was affected both at 6 and 24 h post-incubation with the EV; in this sense, genes belonging to this pathway were modified in a way that would keep this signaling pathway inactive (Garcia-Silva, Cabrera-Cabrera, et al., 2014). As previously mentioned, this family of proteins regulates aspects related to motility and cell morphology through the rearrangement of the cytoskeleton and the regulation of the actin cytoskeleton is one of the pathways identified as affected by the incubation with EV (Retana Moreira et al., 2019). As stated by Garcia Silva et al., cytoskeletal reorganization is recognized as one of the main processes that takes place during the entry of *T. cruzi*, with actin depolymerization most likely facilitating this entry (Garcia-Silva, Cabrera-Cabrera, et al., 2014). In this context, EV-triggered depolymerization of the actin cytoskeleton in the early stages of the interaction would facilitate the initial entry of *T. cruzi* into the host cell. Indeed, EV affect host cell actin filaments, which allows the migration of lysosomes and the formation of the parasitophorous vacuole required for parasite internalization (Torrecilhas et al., 2020).

In this study, results from our experiments revealed downregulation of *Cdc42* and overexpression of *RhoA* and *Rac1* 15 min after the interaction of cells with EV, in contrast to the interaction of cells with the infective trypomastigote stage of the parasite; however, a downregulation of the 3 genes 30 min and 4 h after the interaction of cells with EV was then observed, a phenomenon that coincides with results obtained at 4 h post infection. As previously mentioned, the overexpression of the

protein SRGAP3 after the 4-hour EV-cell interaction is noteworthy, as it is a protein that blocks Cdc42 (Wong et al., 2001) in particular. Besides, increased concentrations of intracellular free calcium and disruption of the actin filaments could be also related to the effect EV of trypomastigotes exert over Rho-GTPases signaling pathways.

EV have gained considerable interest as mediators of cell death. In this sense, the results presented in this work (Figure 5) suggest a “protective” role of EV of *T. cruzi* against apoptosis, as relative values of early and late apoptosis of cells incubated with EV and then treated with taxol at a low concentration are significantly lower than cells treated only with the anti-neoplastic agent. Taxol (paclitaxel) acts by promoting tubulin dimerization and inhibiting the depolymerization of microtubules, which results in the formation of abnormally stable and non-functional microtubules (Steed & Sawyer, 2007); as a result of continuous exposure, mitosis could not be completed, resulting in mitotic metaphase arrest and cellular toxicity (Band Horwitz, 1992; Y. H. Choi & Yoo, 2012).

The anti-apoptotic role of EV of other origin has been demonstrated by several authors (Bruno et al., 2012; Crompton et al., 2017; S. Han & Rhee, 2018; Kim et al., 2017; Sun et al., 2017).

In the case of EV secreted by microorganisms, both roles of the vesicles in attenuating or promoting cell death (Sanwlani &

Gangoda, 2021), depending on different factors, including the species, have been demonstrated.

In the specific context of parasites, it has been reported that EV secreted by the protozoan parasites *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* can induce *in vivo* a proinflammatory response and apoptosis (Sanwani & Gangoda, 2021; Schorey et al., 2015). Besides, it has been reported that the EV of *Plasmodium falciparum* are able to induce programmed cell death processes in the parasite's population by inducing apoptosis in highly parasitized cultures (Correa et al., 2019). For *T. cruzi*, this is the first study that evaluates the role of EV in apoptosis. It is noteworthy that transcriptomic analysis supports this possible anti-apoptotic role as the upregulation of the long non-coding RNA of HOXA-AS2 was found, mentioned above. Besides, overexpression of CSNK1G1, a protein of the casein kinase family, was identified by Western blot. Isoforms of the casein kinase 1 (CK1) family have been shown to phosphorylate key regulatory molecules involved in the cell cycle, transcription and translation, the structure of the cytoskeleton, cell-cell adhesion and receptor-coupled signal transduction; moreover, they regulate key signaling pathways known to be critically involved in tumor progression (Schitteck & Sinnberg, 2014). Although most evidence points to important regulatory roles of the isoforms CK1 $\alpha$ , CK1 $\delta$  and CK1 $\epsilon$ , and the role of the gamma-isoforms is still enigmatic and not very well investigated (Schitteck & Sinnberg, 2014) an anti-apoptotic function of CK1 $\alpha$  in the extrinsic apoptosis pathway has been shown. As the isoforms

have a high homology (Schitteck & Sinnberg, 2014), we could also hypothesize an anti-apoptotic role of CSNK1G1. However, more studies are needed to confirm this hypothesis and to describe in detail the apoptotic signaling pathways that EV of *T. cruzi* exert.

It has been reported that shed trypomastigote components present in parasite-conditioned medium are implicated in triggering several signaling cascades in host cells to facilitate different processes, including the activation of anti-apoptotic responses (Mott et al., 2009); more specifically, *trans*-sialidase purified from conditioned supernatants of Vero cells infected with the *T. cruzi* Silvio-X10/4 strain was able to induce neurite outgrowth and rescued PC12 cells from apoptotic death caused by growth factor deprivation (Chuenkova & PereiraPerrin, 2005). The presence of different *trans*-sialidases in the proteome of EV of *T. cruzi* has been confirmed in previous works by our research group (Retana Moreira et al., 2021). There are also several lines of evidence that *T. cruzi* can up or downregulate apoptosis of fibroblasts and macrophages, and that the role of apoptosis in the pathogenesis of the disease is related to the parasite clones and their different abilities to invade and proliferate within host cells (de Souza et al., 2003). In this regard, the anti-apoptotic effect of EV observed in this study could vary employing other cell lines and strains of the parasite. Therefore, the effect of EV of *T. cruzi* over apoptosis ought to be investigated in more detail, as EV carry a variety of proteins and microRNAs into target cells and cell apoptosis is a complex multi-pathway process.

## Methods

**Cell culture, parasite strain and infection of cells with *T. cruzi*.** Vero cells (ECACC 84113001) were cultured in Nunc cell-culture flasks of 75 cm<sup>2</sup> surface area (Thermo Fischer Scientific, USA) with Modified Eagle's Medium (MEM) (Sigma, USA) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (iFBS) (Gibco, USA) plus antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL). The cell cultures were maintained at 37 °C, in a moist atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub>.

Cells were initially infected with purified metacyclic trypomastigotes of the Pan4 (Tc Ia + Tc Id) strain of *T. cruzi*, isolated in Panama in 2004 and maintained in culture and cryopreserved in our laboratory. Vero cell monolayer was disrupted with trypsin-EDTA solution, the cells were counted in a Neubauer chamber and placed on a new culture flasks at 1x 10<sup>6</sup> cells/mL in MEM +10% iFBS. Once the cells were attached to the surface of the flask (approximately after 12 h), cells were washed with Hank's solution to remove iFBS and infected with a suspension of the metacyclic forms obtained in culture and purified in Percoll according to the methodology described by Castanys et al. (1984) (Castanys et al., 1984). Cell cultures were incubated with the parasites for 6 h in MEM without iFBS, the parasite/cell ratio was 3 parasites per cell. After this time, parasites present in the cell culture supernatant were removed, cell cultures were washed with Hank's solution and fresh MEM + 10% iFBS was added. After 120 h of the intracellular development of the parasite, tissue-culture cell-derived

trypomastigotes (TcT) were harvested by centrifugation (De Pablos et al., 2011). For this purpose, the culture medium was collected from the infected monolayers every 24 h and then centrifuged at 3,000 x g for 5 min. The resulting pellet with the parasites was washed in sterile PBS four times and resuspended in RPMI culture medium (Sigma, USA) buffered with 25 mM HEPES (pH 7.2) and supplemented with 10% exosome-free iFBS, for the subsequent isolation of EV.

The cell line was routinely monitored for *Mycoplasma* by PCR, using primers GPO-3 and MGSO as described by van Kuppeveld et al in 1994 (Kuppeveld et al., 1994).

**Isolation of extracellular vesicles.** EV of trypomastigotes of *T. cruzi* were obtained as previously described by Díaz Lozano et al. and Retana Moreira et al. (Díaz Lozano et al., 2017; Retana Moreira et al., 2019). Briefly,  $5 \times 10^7$  trypomastigotes of *T. cruzi* were incubated for 5 h in 5 mL RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) buffered with HEPES 25 mM (pH 7.2) and supplemented with 10% exosome-free heat inactivated fetal bovine serum (iFBS). After this time, the parasites and cell debris were eliminated after centrifugation at 3,500 x g for 15 min and the supernatant was collected. In order to eliminate larger EV and to obtain an exosome-enriched pellet, the supernatant was centrifuged at 17,000 x g for 30 min at 4 °C and then filtered through a 0.22 µm-pore filter (Sartorius, Göttingen, Germany), for subsequent ultracentrifugation at 100,000 x g for 18 h in an Avanti J-301 ultracentrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) with a JA-30.50 Ti Rotor. In this case, the resulting pellet was

washed three times in sterile-filtered (0.22 µm pore filter) PBS, using a Sorval WX80 ultracentrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a F50L-24 x 1.5 fixed-angle rotor, and finally resuspended in 100 µL PBS. The viability of trypomastigotes after the 5-h period of EV secretion was evaluated using the trypan blue exclusion test, maintaining a percentage of 99% viable parasites

The EV isolation procedure was evaluated by transmission electron microscopy, atomic force microscopy and nanoparticle tracking analysis, as described in previous works (Retana Moreira et al., 2021). The protein concentration of each EV was quantified using the Micro-BCA protein assay (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and the presence of *T. cruzi*-specific protein markers in EV was evaluated by Western blot.

**Transmission electron microscopy.** To confirm the production of EV by trypomastigotes of *T. cruzi*, EV obtained after the isolation procedure were resuspended in 30 µL sterile-filtered PBS (pH 7.3) and 5 µL of the suspension was adsorbed directly onto Formvar/carbon-coated grids. After 30 min, the grids were washed in PBS, fixed in 1% glutaraldehyde for 30 min, washed once again in PBS and stained and contrasted with 2% (v/v) uranyl acetate. The visualization of the samples was achieved using a Carl Zeiss LIBRA 120 PLUS SMT electron microscope at the “Centro de Instrumentación Científica” of the University of Granada, and the size of the vesicles was measured using the Image J 1.41 software.

**Atomic force microscopy.** Topographic imaging of the EV of *T. cruzi* was performed using the non-contact AFM mode in an NX-20 instrument (Park Systems, Suwon, Korea) with ACTA cantilevers ( $K = 40 \text{ N m}^{-1}$  and  $f = 320 \text{ kHz}$ ), as previously described (Retana Moreira et al., 2021). Briefly, each EV sample was diluted 1:4 in sterile-filtered PBS and 8  $\mu\text{L}$  of the dilution of EV was deposited onto freshly cleaved muscovite mica. After 10 min, the substrate with the sample was rinsed three times with MilliQ water (Millipore, Burlington, MA, USA) and further dried with a gentle stream of argon. Images were typically acquired as  $256 \times 256$  pixels at a scan rate of 0.5–0.7 Hz, and processed and analyzed using XEI software (Park Systems, Suwon, Korea). Representative images of samples were obtained by scanning at least 3 different locations on at least 3 different samples.

**Nanoparticle tracking analysis.** Distribution, size, and concentration of the EV samples of *T. cruzi* were determined by measuring the Brownian motion rate according to the particle size using a NanoSight NS300 (Malvern Instruments, UK), a system equipped with an sCMOS camera and a blue 488 nm laser beam. For the analysis, samples of EV were diluted 1/100 in low-binding Eppendorf tubes with sterile-filtered PBS just before the measurements, which were performed at 25 °C. For data acquisition and information processing, the NTA software 3.2 Dev Build 3.2.16 was used. The particle movement was analyzed by NTA software with the camera level at 16, slider



shutter at 1200 and slider gain at 146. The mean size distribution was calculated as a mean of three independent size distributions.

**Identification of protein markers in EV of *T. cruzi* by Western blot.** To confirm the presence of *T. cruzi*-specific proteins in EV secreted by trypomastigotes, Western blots using anti-*trans*-sialidase (mAb39) antibody were performed, following the methodology described by Retana Moreira et al. in 2021 (Retana Moreira et al., 2021). For the analysis, 30 µg of EV of trypomastigotes were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes (Trans-Blot Turbo Midi PVDF Transfer Packs, Bio-Rad Laboratories, USA) for 40 min at 40 V in a Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, USA), and blocked overnight with 5% non-fat milk in PBS-0.1% Tween 20. The membranes were then washed in PBS-0.1% Tween 20 and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody anti-TS mAb 39 (1:1,000) (produced in mice). After the incubation, the membranes were washed in PBS-0.1% Tween 20 and incubated for 1 hour with secondary antibody goat anti-mouse IgGs conjugated with peroxidase (1:1,000) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The reaction was visualized using Clarity ECL Western substrate (BioRad, Hercules, CA, USA) in a ChemiDoc Imaging System (BioRad, Hercules, CA, USA).

**Incubation of Vero cell cultures with EV of *T. cruzi*.** Cultures of  $1 \times 10^6$  Vero cells were grown for 24 – 48 h in Nunc 6-well

plates (Thermo Fischer Scientific, USA) using MEM supplemented with 10% iFBS and antibiotics, as previously described. Thereafter, the monolayers were washed 3 times in serum-free MEM and incubated for 4 h with EV of trypomastigotes of *T. cruzi* resuspended in serum-free MEM. The concentration of total protein of EV employed was 0.38 µg/mL (equivalent to  $\sim 2.7 \times 10^8$  EV/mL), since it was established as the effective dose (ED) 50 in previous investigations by our group, using the same strain of the parasite, EV isolation procedure and incubation conditions (Retana Moreira et al., 2019). After the incubations, culture media were removed and the cells were submitted to RNA extractions for gene expression analyses by RT-qPCR and transcriptome analysis.

**RNA extraction.** Total RNA of the cell cultures incubated with EV of trypomastigotes of *T. cruzi* was extracted using TriZOL reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), following the manufacturer's recommendations. An approximate quantification and purity evaluation of the samples was achieved using a Nanodrop spectrophotometer, after determining absorbance at 260 nm. RNA samples were also quantified and quality-checked in an Agilent 2100 Bioanalyzer, using the Agilent RNA 6000 Kit.

**Transcriptome analysis.** In order to determine the effect of EV of trypomastigotes of *T. cruzi* over cells at the transcriptome level, Illumina's TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit was employed to prepare the libraries, following the manufacturer's

instructions. Briefly, each sample was enriched in mRNA by selecting those molecules with a poly-A tail at their 3' end. Captured mRNAs were then converted into cDNA and sequencing adaptors were added to their ends. The samples were dual-indexed for post-sequencing demultiplexing.

The fragment size distribution and concentration of the libraries were checked in the Agilent 2100 Bioanalyzer using the Agilent DNA 1000 Kit and the quantification of the libraries was performed using the Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Then, they were pooled in equimolar amounts according to the Qubit results. Finally, the resulting pool was sequenced in a fraction of a NovaSeq6000 S4 flow cell (Illumina).

The quality of the raw sequencing data was checked using FastQC 0.11.15. Reads that contained adapter sequences and/or that showed low-quality were identified and trimmed using Trimmomatic 0.36 (Bolger et al., 2014). Then, a second quality check was performed using FastQC 0.11.15 to make sure only high-quality reads were used for the mapping step.

Read counts were quantified using htseq-counts. The counts were also normalized and filtered following the Trimmed Mean of M-values (TMM) method (M. D. Robinson & Oshlack, 2010). Finally, differential expression between the samples (cell control: CC and cells incubated with EV of *T. cruzi*: CEV) were analyzed

using the Bioconductor package NOISeq. The probability threshold was set at  $q = 0.95$ .

**Bioinformatic analyses.** For transcriptome results, differential expression analyses were performed using the edge R package and an experimental based design matrix comparing the EV-incubated samples against the control group (cells without the incubation with EV of *T. cruzi*). Further, differentially expressed genes were identified at the  $p$ -value of  $<0.01$  and  $\log_2$  fold change  $>2$  (LogFC).

Integrative analysis was performed in R (v3.6), to obtain the lists of genes that overlap with publicly available datasets of interest. Briefly, a list of differentially expressed genes up- or downregulated (DEGs) underwent an unbiased approach to characterize our datasets enrichment analysis of gene ontology terms on our datasets with WebGesalt 66 and David v6.8 (accessed on April 2021, current version available at <https://david.ncifcrf.gov>) servers, using both over-representation and gene-set enrichment modes with default settings, as well as in R using ClusterProfiler 67. Information from all significantly enriched terms ( $p$ -value  $<0.05$ ) from all datasets was pooled to interpret the evaluated datasets.

**Gene expression analyses of Rho-GTPases by RT-qPCR.** To determine the effect of EV of trypomastigotes of *T. cruzi* over the expression of Rho/Rho kinases in cells, the specific expression of *RhoA*, *Rac1* and *Cdc42* genes was analyzed after the incubation of Vero cells with EV of *T. cruzi* during different time

points (15 min, 30 min, 4 h and 24 h). The same analysis was performed after the stimulation with  $10^6$  trypomastigotes forms for the different times as a positive control. After obtaining the RNA of the cell cultures as described above, reverse transcription was performed using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany) which contains a DNA digestion step. Then, quantitative PCRs were performed with the resulting cDNAs in 10  $\mu$ L volumes, using a CFX-96 Real Time System (Bio-Rad Laboratories, USA). Each reaction included 5  $\mu$ L SsoFast® EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, EEUU), 1  $\mu$ L each forward and reverse primer, 1  $\mu$ L ultrapure water and 1  $\mu$ L cDNA (50 ng). The protocol employed consisted of an enzyme activation step at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 sec and annealing at 60 °C for 10 sec. A melt gradient step was applied to the end of RT-qPCR reactions, ranging from 65 °C to 95 °C in 0.5 °C increments.

Relative expression of the genes was calculated using the comparative cycle threshold (Ct) method with *GAPDH* and *18 S* as normalizer genes. The primers employed in this study, as well as the sequences, are listed in Table S1. RT-qPCRs were performed following the “Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments published by Bustin et al in 2009 (Bustin et al., 2009). The effect of trypomastigotes of *T. cruzi* over the expression of Rho/Rho kinases in cells was also included as a positive control of the experiment.

**Differential gene expression in Vero cells incubated with EV of *T. cruzi*.** In order to confirm and validate transcriptomic results, the differential expression of several genes, including *CD29*, *PSMC1*, *PSMD6*, *MALT1*, *PLXNC1*, *UBE2C*, *SUMO1*, *SUMO2* and *RABL3* was also analyzed by RT-qPCR, employing *GAPDH* as the normalizer gene. In this case, TaqMan assays were performed with the TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fischer Scientific, USA) following the manufacturer's protocol. Briefly, each reaction included 5  $\mu$ L TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X), 0.5  $\mu$ L TaqMan Assay (20X), 3.5  $\mu$ L ultrapure water and 1  $\mu$ L cDNA (50 ng). The thermal cycler protocol employed consisted of an initial step at 50 °C for 2 min, followed by an enzyme activation step at 95 °C for 2 min, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 3 sec and annealing/extending step at 60 °C for 30 sec. A melt gradient step was applied to the end of RT-qPCR reactions, ranging from 65 °C to 95 °C in 0.5 °C increments. TaqMan assay IDs employed for the analysis are listed in Table S2.

**Differential protein expression in Vero cells incubated with EV of *T. cruzi*.** The differential expression of distinct proteins in cells incubated with EV of trypomastigotes of *T. cruzi* was also analyzed. In this case, the expression of casein kinase CSNK1G1, a protein of the casein kinase family involved in multiple cellular processes in eukaryotes like cell differentiation, proliferation and apoptosis 69, and srGAP2 (SLIT-ROBO Rho-GTPase-activating protein 2, also known as formin-binding protein 2 FNBP2), a protein that interacts with a novel family of

Rho-GTPase activating proteins (GAPs) and inactivates Cdc42 (a member of the Rho-GTPase family involved in regulating the actin cytoskeleton) (Wong et al., 2001), was achieved by Western blot. Briefly, Vero cells were grown and incubated with EV of trypomastigotes of the parasite for 4 h. After this time, the cell monolayers were washed using cold sterile PBS and submitted to a lysis step using RIPA buffer (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40 (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 1.0 mM EDTA, 0.1% SDS (w/v) and 0.01% sodium azide (w/v), pH 7.4). After the lysis, protein quantification of each sample was performed with the Bradford protein assay (Thermo Fisher Scientific, USA) following the manufacturer's instructions and the samples were diluted (60 µg per sample) 1:1 in sample buffer (Laemmli, 1970), heated for 9 min at 98 °C and subsequently loaded onto 12.5% SDS-polyacrylamide gels for an electrophoretic run for 90 min, using a voltage of 120 V. Once the electrophoresis was completed and an evident separation of the bands in the protein marker was obtained, the proteins in the gel were transferred to PVDF membranes and the Western blot protocol was achieved as described above. In this case, the primary antibodies employed are listed in Table S3, following the dilutions recommended by the manufacturers. Secondary antibodies consisted of goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgGs conjugated with peroxidase (1:1,000) (Dako Agilent Pathology Solutions, USA). Finally, a loading control was achieved using the anti-GAPDH antibody (1:5,000) (Sigma Aldrich, USA).

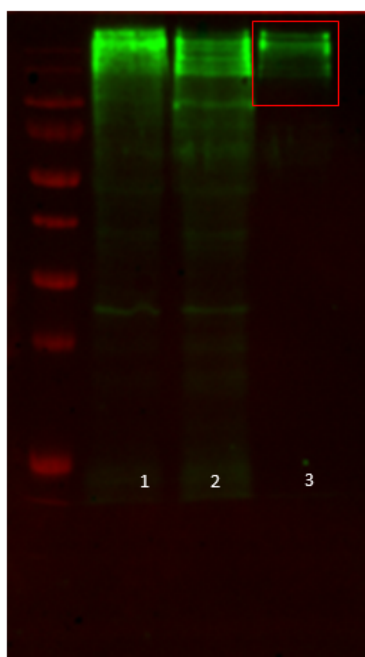
**Effect of EV of *T. cruzi* over apoptosis.** To evaluate the effect of EV of trypomastigotes over apoptosis,  $1 \times 10^6$  Vero cells were grown onto Nunc 6-well plates (Thermo Fischer Scientific, USA) for 24 h and then preincubated with EV of *T. cruzi* for 2 h. Then, the cell monolayers were washed in MEM and the apoptosis inductor taxol (paclitaxel, an antineoplastic agent) was added at a concentration of  $0.1 \mu\text{g/mL}$ , with the subsequent addition of EV every 8 h during 72 h. After 72 h of culture, the supernatants of each well were removed and cells were harvested using 0.5% EDTA in PBS. The cells were washed using cold sterile PBS and then labeled with fluorescent dyes annexin V and FITC, using an apoptosis detection kit (Trevigen, USA). In this case,  $10 \mu\text{L}$  of binding buffer and  $1 \mu\text{L}$  of annexin V-FITC were added to each sample, mixed gently and incubated for 15 min at room temperature in the dark. Finally,  $8 \mu\text{L}$  of propidium iodide in  $400 \mu\text{L}$  of binding buffer 1X was added just before the analysis, which was performed in a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). The results obtained were analyzed using the FlowJo v7.6.5 software (Tree Star Inc., USA).

**Experimental Design and Data Analyses.** All experiments were done in an exploratory manner. Thus, P values have to be interpreted as descriptive only. The decision to perform three independent experiments was made prior to their execution based on the level of variation observed in previous work and sample availability.

Statistical comparisons were performed with repeated-measures one-way or two-way ANOVA or Friedman test using respective

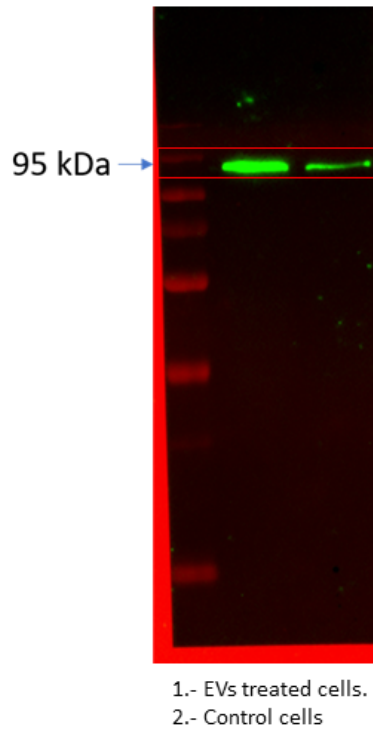


post hoc tests for multiple comparisons against specified controls as recommended by the analysis software and described in the figure legends. Comparisons to a hypothetical value were performed with one sample t test or Wilcoxon signed rank test for means or medians, respectively. All calculations were done with GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software, San Diego, CA).

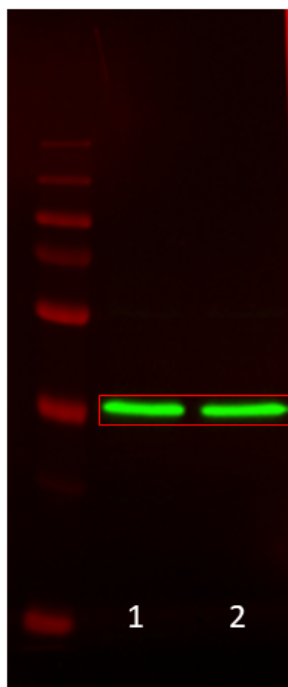


1.- Lysate of Trypomastigotes  
2.- Lysate of Trypomastigotes  
3.- Exovesicles

**Supplementary Figure 1** (Original Figure 1D). Western blot analysis of transialidases in extracellular vesicles of trypomastigotes of *T. cruzi*.

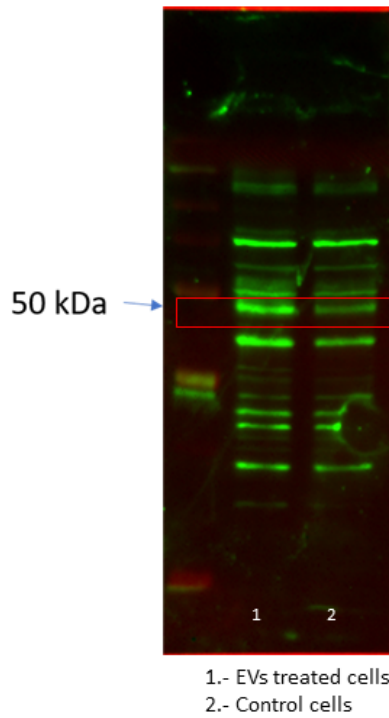


**Supplementary Figure 2** (Original Figure 4B). Western blot analysis of SRGAP3 in a lysate of EVs-stimulated Vero cells (1) and non-stimulated Vero cells (2).



1.- EVs treated cells.  
2.- Control cells

**Supplementary Figure 3** (Original Figure 4B and 5B). Western blot analysis of GAPDH in a lysate of EVs-stimulated Vero cells (1) and non-stimulated Vero cells (2).



**Supplementary Figure 4** (Original Figure 5B). Western blot analysis of CSNK1G1 in a lysate of EVs-stimulated Vero cells (1) and non-stimulated Vero cells (2).



## 6. Capítulo 3

**Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* and immune complexes they form with sialylated and non-sialylated IgGs increase small peritoneal macrophage subpopulation and elicit different cytokines profiles**

Frontiers in Immunology. 2023. 14,1215913.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1215913>

Cuartil: Q1

Índice de impacto: 7,3



## **Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* and immune complexes they form with sialylated and non-sialylated IgGs increase small peritoneal macrophage subpopulation and elicit different cytokines profiles**

**Alberto Cornet-Gomez<sup>1†</sup>, Lissette Retana Moreira<sup>1, 2, 3†</sup>, Mercedes Gomez-Samblás<sup>1</sup>, Antonio Osuna<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular (CTS 183), Departamento de Parasitología, Campus de Fuentenueva, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

†These authors contributed equally to this work.

### **Correspondence:**

Antonio Osuna; [aosuna@ugr.es](mailto:aosuna@ugr.es)

**Keywords:** extracellular vesicles, trypomastigotes, *Trypanosoma cruzi*, macrophages, interleukines, immune modulation

### **Abstract**

American trypanosomiasis, or Chagas disease, is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and is characterized by the presence of cardiac or gastrointestinal symptoms in a large number of patients during the chronic phase of the disease. Although the origin of the symptoms is not clear, several mechanisms have been described involving factors related to *T. cruzi* and the host immune response. In this sense, the extracellular vesicles (EVs) secreted by the parasite and the immune complexes (ICs) formed after their recognition by host IgGs (EVs-IgGs) may play an important role in the immune



response during infection. The aim of the present work is to elucidate the modulation of the immune response exerted by EVs and the ICs they form by analyzing the variation in the subpopulations of small and large peritoneal macrophages after intraperitoneal inoculation in mice and to evaluate the role of the sialylation of the host IgGs in this immunomodulation. Both macrophage subpopulations were purified and subjected to cytokine expression analysis by RT-qPCR. The results showed an increase in the small peritoneal macrophage subpopulation after intraperitoneal injection of parasite EVs, but a greater increase in this subpopulation was observed when sialylated and non-sialylated ICs were injected, which was similar to inoculation with the trypomastigote stage of the parasite. The cytokine expression results showed the ability of both subpopulations to express inflammatory and non-inflammatory cytokines. These results suggest the role of free EVs in the acute phase of the disease and the possible role of immune complexes in the immune response in the chronic phase of the disease, when the levels of antibodies against the parasite allow the formation of immune complexes. The differential expression of interleukins showed after the inoculation of immune complexes formed with sialylated and non-sialylated IgGs and the interleukins expression induced by EVs, demonstrates that the IgG glycosilation is involved in the type of immune response that dominates in each of the phases of the Chagas disease.

## Introduction

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is the causative agent of American trypanosomiasis or Chagas disease, considered a neglected infectious disease by the World Health Organization. Recent studies estimate that there are 6-7 million people infected with this parasite, approximately 14,000 deaths per year by causes related to the infection, and approximately 80 million people at risk of infection (Pérez-Molina & Molina, 2018; WHO, 2022). Chagas disease was initially restricted to geographical areas where the natural biological cycle of the parasite was maintained, comprising 21 countries in the Americas; however, it has become a global health issue as a result of migratory movements. Besides transmission through contact with feces of infected triatomine bugs of the family Reduviidae (subfamily Triatominae), infection with the parasite can occur by oral, transfusional or through vertical routes, epidemiologically important in areas where vector-borne transmission does not occur (Kemmerling et al., 2019; Moncayo & Silveira, 2009).

The course of Chagas disease presents two phases: acute and chronic. The acute phase corresponds to the first weeks of infection with this intracellular parasite, in which no clear pathognomonic symptoms are present, but high parasitemia can be observed. The chronic phase appears from the 3<sup>rd</sup> to the 8<sup>th</sup> week after infection and, during this phase, the presence of trypomastigotes (the infective stage of the parasite for the vertebrate host) in blood is drastically reduced; however, the individual remains infected for decades. It is estimated that only

30-40% of infected individuals will develop characteristic symptoms of the disease during the chronic phase (determinate form of the disease), including cardiac involvement or gastrointestinal megasyndromes (Coura, 2007; Messenger et al., 2017).

During an infection with *T. cruzi*, the immune system plays a crucial role; in this sense, the innate immune response is able to detect the pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) present on the parasite's surface, most of which are the glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *T. cruzi* mucin-like glycoproteins (GPI-mucins). These molecules are recognized by Toll-like receptors (TLRs), which are part of a group of receptors called pattern recognition receptors (PRRs) (Campos et al., 2001; Ropert & Gazzinelli, 2000). Stimulation of TLRs is important in controlling parasitemia through the production of cytokines such as IL-12 and IFN- $\gamma$ . During the acute phase of the disease, an increased production of inflammatory cytokines (IL-12, IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 and CXCL10) is observed. Following PAMP recognition, antigen presenting cells (APCs) initiate the adaptive immune response necessary to control parasitemia, leading to the production of specific antibodies and the activation of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. Moreover, during this phase, the inflammatory response (Th1 and Th17) also leads to the production of nitric oxide (NO), and this response is related to the resistance to *T. cruzi* infection and control of parasitemia (Gao & Pereira, 2002; Machado et al., 2000; Miyazaki et al., 2010). Although the inflammation process

elicited during the acute phase of the disease is able to control parasitemia, it does not completely eliminate the parasite, leading to the chronic phase, in which a fine balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines and an effective cellular response needs to be reached to keep parasite levels in check while avoiding tissue damage (D. V. Andrade et al., 2014).

Macrophages are considered to be part of the first barrier to prevent infections, acting as antigen-presenting cells to CD4+ T lymphocytes. Under normal physiological conditions, monocytes present a quiescent state (M0: CCL1-, CD163-, CD14+) (Tsuchimoto et al., 2015); however, macrophages have been classified as M1 and M2, the former based on classical activation, and M2 designated for alternatively activated macrophages. M1 macrophages are mostly induced by TLR ligands (bacterial lipopolysaccharides, LPS) or by some cytokines, such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and GM-CSF. On the other hand, M2 macrophages refer to alternatively activated macrophages and can be polarized by various stimulatory factors, such as cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13), glucocorticoids or immune complexes and LPS. This macrophage classification into M1 and M2 is maintained despite evidence that M2 designation encompasses cells with different physiological and biochemical patterns (Edwards et al., 2006). Moreover, in 2010, Ghosn et al. described two subpopulations of peritoneal macrophages with physically, functionally and evolutionarily different immunological markers: i.) large peritoneal macrophages (LPM), of embryonic origin and that express high levels of CD11b and F4/80, and ii.) small peritoneal

macrophages (SPM) of monocytic origin and that express lower levels of CD11b and F4/80 but higher levels of MHC-II. LPM are the majority subpopulation in unstimulated animals but, upon inflammatory stimuli, for example, with LPS, thyoglycolate or after inoculation of *T. cruzi* flagellate forms, SPM become the majority subpopulation (Bou Ghosn et al., 2010; A. dos A. Cassado et al., 2011). SPM, but not LPM, have the ability to present antigens to naive CD4+ T cells via the activating receptor DNAM-1 (CD226) (Takenaka et al., 2018). These authors propose that SPM are functionally distinct from LPM and that DNAM-1 plays a co-stimulatory role in antigen presentation by SPM. An increased phagocytic capacity of SPM and differences in cytokine production have also been reported. Despite these facts, the role of each macrophage subset has never been described, making it impossible to fit them into the classical M1/M2 classification (A. A. Cassado et al., 2015).

IgGs are traditionally recognized as mediators of the humoral immune response. Antibodies bind and neutralize antigens by their Fab region to promote complement-dependent cytotoxicity resulting from binding of antibodies via the Fab region to antigen epitopes and binding of Fc regions to complement, binding to specific receptors (FcR) present on the cell membranes of lymphoid cells and in particular of macrophages, which allows the opsonization of antigens and the initiation of phagocytosis of immune complexes by these phagocytic cells.

Based on these receptors present on the surface of macrophages, the effector functions initiated by antibodies and

recognized as proinflammatory mediators of the humoral immune response are triggered by the Fc domain upon binding to FcR receptors. Fc  $\gamma$  receptor IIb (Fc $\gamma$ RIIb) is the only inhibitory Fc $\gamma$ R in the Fc $\gamma$ R family (Udompornpitak et al., 2021). These effector functions are largely dependent on the N-terminally bound biantennary glycan of IgG heavy chains, which is located below the Ig hinge region (da Silva et al., 2017; Vattepu et al., 2022). This glycan is considered to hold the two Fc heavy chains in an open conformation necessary to interact with activating Fc $\gamma$ R receptors (Fc $\gamma$ Rs). However, the presence in the sugar chain of terminal sialic acid in the glycan has profound implications on the effector functions of Fc by inhibiting activation by cells (Anthony & Ravetch, 2010), and it is the FcR $\gamma$ IIb receptors that would be responsible for binding to such immunoglobulins carrying sialic acid in their Fc region (Takai et al., 1996). The presence of sialic acid, bound in an  $\alpha$ 2,6 bond to the penultimate terminal galactose of the glycan reduces Fc $\gamma$ R binding and converts IgG antibodies to anti-inflammatory mediators demonstrated activity (Anthony et al., 2008; Schwab et al., 2014). Thus, glycosylated IgGs in Fc would be responsible for the *in vivo* anti-inflammatory activity of Intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy (Anthony et al., 2008). Where immune complexes with sialylated Fcs initiate an anti-inflammatory cascade via the receptor or lectin SIGN-R1 (O'Neill et al., 2013). Instead of binding to the Fc $\gamma$ R, sialylated Fcs may rather interact with inflammatory cells by the FcR inhibitor, Fc $\gamma$ RIIb, or via the lectin receptor SIGN-R1 or DC-SIGN and the initiate an anti-inflammatory cascade. This leads to an inhibitory Fc $\gamma$ RIIb surface expression on inflammatory cells, thus

attenuating the inflammation initiated by autoantibodies in autoimmune diseases where this type of therapy has been used (Vattepu et al., 2022). In addition, other authors have recently proposed the hypothesis that non-fucosylated IgGs in serum can saturate FcγR3a in immune cells due to its high affinity for the receptor and thus modulate immune responses, demonstrating how the anti-inflammatory activity of IVIG is mediated through activating blockade of the FcγR by galactosylated IgGs, modulating by inhibiting antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). and complement-dependent cytotoxicity (Mimura et al., 2022).

Extracellular vesicles (EVs) are small membrane-coated vesicles released into the extracellular milieu by all cell types, and classified according to their size, biogenesis and composition (Théry et al., 2018). In *T. cruzi*, the cargo of EVs is complex and includes nucleic acids (DNA, RNA and miRNA), proteins, lipids and different metabolites (Bayer-Santos et al., 2013; de Pablos Torró et al., 2018; Marcilla et al., 2014; van der Pol et al., 2012). In previous studies, our research group characterized some of the biological properties of EVs released by different stages of the parasite, studying some of their physical properties, the effects of the interaction between these EVs and cells at the molecular level, the localization and presence of *trans*-sialidases, the formation of immune complexes EVs-IgGs in the plasma of patients and the role they play in inhibiting the complement system; the presence of immune complexes in patients sera means that they could play a role a systemic level (De Pablos et al., 2016; Díaz Lozano et al., 2017; Retana Moreira et al., 2019,

2021). Garcia-Silva et al. (Garcia-Silva, Cabrera-Cabrera, et al., 2014) studied the changes induced by EVs secreted by non-infective stages of *T. cruzi* over HeLa cells, finding that the expression of inflammatory interleukins IL-1, IL-6 and IL-18 was increased even after the stimulation with EVs secreted by these non-infective forms. Other groups have also evidenced the ability of EVs of the parasite to induce the release of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) and NO production by murine macrophages by interacting with TLR2 (Cronemberger-Andrade et al., 2020; Nogueira et al., 2015). In this sense, it is well known that *T. cruzi* is present in biological fluids, including ascitic fluid, and is capable of forming nests of amastigotes and trypomastigotes in the peritoneal membrane, not only in the chronic phase but also in the acute phase of the infection. (De Yarbuh et al., 2013). On the other hand, the histopathological presence of *T. cruzi* amastigotes nests have been described in different organs such as liver, spleen, pancreas or colon; high concentrations of *T. cruzi* DNA was found in the myocardium, urinary bladder, stomach, lymph nodes, adrenal gland, and colon (Penas et al., 2016; Ward et al., 2020; Williams et al., 2009).

In the present work, we present an analysis of the variation of peritoneal macrophage subpopulations after the intraperitoneal cavity inoculation of mice with EVs of tissue-culture cell-derived trypomastigotes of *T. cruzi*, including analyses of interleukin profiles expressed by these two populations after the EVs-stimulus. Stimulation of mice with immune complexes formed *in vitro* after the incubation of EVs of the parasite with sialylated or non-sialylated IgGs anti-*T. cruzi* are also included, assessing the



potential differences that sialylated immunoglobulins could play in the activation processes. In the present work, using as a model of “inflammatory response” the variations in the populations of peritoneal macrophages in the presence of forms of *T. cruzi* already described by (Bou Ghosn et al., 2010; A. dos A. Cassado et al., 2011), we study the role played by the immune complexes formed by the extracellular vesicles of the parasite recognized by sialylated and non-sialylated IgGs, all of them purified from an immunoserum against the parasite antigens, as well as the different expression of cytokines expressed by the different populations of peritoneal macrophages that emerged after intraperitoneal inoculation of the different stimuli.

## **Materials and Methods**

### **Cell culture and parasite strain**

Vero cells (ECACC 84113001) were obtained from the cell bank of the “Centro Instrumentación Científica” of the University of Granada. The cells were cultured in 75 cm<sup>2</sup> surface area flasks (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) using Modified Eagle’s Medium (MEM) medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% heat-inactivated (56 °C, 30 min) fetal bovine serum (iFBS) (Gibco, Waltham, MA, USA) plus antibiotics (penicillin 100 U/mL; streptomycin 100 µg/mL) and maintained at 37 °C, in a moist atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub>.

For Vero cell infection with the infective trypomastigote stage of the parasite, or for the collection of its secreted products for EVs

purification, the *T. cruzi* Pan4 (Tc Ia + Tc Id) strain (Cura et al., 2010) was used. This strain was isolated by our group in 2004, in collaboration with Dr. A. Ying of the University of Panama, and it is maintained in culture and cryopreserved in our laboratory. Cell infections were performed as previously described (De Pablos et al., 2011; Díaz Lozano et al., 2017) and trypomastigotes derived from cell cultures were obtained for EVs collection. Briefly, Vero cell monolayers were disrupted with trypsin-EDTA solution, the cells were washed and then seeded on a new culture flask ( $1 \times 10^6$  cells/mL) using MEM + 10% iFBS + antibiotics. Once the cells had attached to the surface of the flask (12 hours), they were washed with sterile phosphate buffered saline (PBS) and subsequently infected with a suspension of the metacyclic forms obtained in culture and purified using Percoll, according to the methodology described by Castanys et al. (Castanys et al., 1984). Cell cultures were incubated with parasites for 6 hours in MEM culture medium (parasite/cell ratio of 3 parasites per cell) and, after the incubation time, non-internalized parasites were removed, cell cultures were washed with PBS, and fresh MEM + 10% iFBS + antibiotics was added. After 96-120 hours of the intracellular development of the parasite, tissue-culture cell-derived trypomastigotes present in culture supernatant were harvested by centrifugation.

### **Purification of EVs secreted by trypomastigotes**

Trypomastigotes were collected from the supernatant of infected cell cultures, in which the parasite had continuously completed a series of intracellular cycles of development. An initial

centrifugation of the supernatant at 500 x g for 5 minutes was performed to remove cell debris and, once this centrifugation was completed, the resulting supernatant was centrifuged at 3,000 x g for 15 minutes to concentrate the trypomastigotes in the pellet. Then, the pellet with the parasites was washed 3 times in sterile PBS and  $5 \times 10^7$  parasites were placed in 75 cm<sup>2</sup> surface area flasks (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) with 10 mL of MEM without iFBS (pH 7.2) for EVs secretion. Flasks with the parasites were incubated for 5 hours at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> enriched atmosphere. Thereafter, the supernatants were collected and centrifuged at 3,500 x g for 15 minutes at 4 °C to remove the parasites.

For EVs isolation and purification, the methodology previously described by our group was employed (Díaz Lozano et al., 2017; Retana Moreira et al., 2019). Briefly, supernatants with the secreted products of trypomastigotes were subjected to a centrifugation step at 17,000 x g for 30 minutes at 4 °C to remove any apoptotic vesicles and cell debris. After this step, the supernatants obtained were filtered through sterile filters with a pore size of 0.22 µm (Sartorius, Göttingen, Germany, Germany) in order to select EVs with a diameter smaller than the pore size and to remove aggregates or other types of vesicles such as larger ectosomes. The ultrafiltrated samples were then ultracentrifuged at 100,000 x g for 4 hours at 4 °C in a CP100NX ultracentrifuge (Hitachi Koki, Tokyo, Japan) with a P70AT fixed-angle rotor for EVs isolation and, after this centrifugation step, the pellets containing EVs were washed three times by ultracentrifugation using sterile filtered PBS. Finally, EVs were

concentrated by ultracentrifugation in a P50A3 fixed-angle rotor and resuspended in 100  $\mu$ L of sterile filtered PBS.

The isolation procedure and purity of EVs samples were evaluated by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and atomic force microscopy, following the methodologies described in previous works (Díaz Lozano et al., 2017; Retana Moreira et al., 2019, 2021). The protein concentration of EVs was measured using the microBCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions and the viability of trypomastigotes after the 5-hour period of EVs secretion was assessed by the trypan blue exclusion assay, maintaining a percentage close to 99% of live forms.

### **Animal handling and permission of the animal welfare and ethics committee**

The use of animals was carried out according to institutional guidelines (Spanish Government Regulations: Royal Decree RD1201/05) and European Union guidelines (European Directive 2010/63/EU), having been approved by the Ethics Committee of the University of Granada (Ethics Committee, 235-CEEA-OH-2018), as well as by the authorities of the Regional Government of the Junta de Andalucía with number 12/11/ 2017/162.

### **Transmission electron microscopy**

For visualization of EVs, samples obtained from the last ultracentrifugation step were resuspended in 30  $\mu$ L Tris-HCl (pH 7.3) and 5  $\mu$ L of the suspension was applied directly onto Formvar/carbon-coated grids. After 30 minutes, the grids were

washed in PBS and fixed in 1% glutaraldehyde for 30 minutes. After the fixation step, the grids were washed again in PBS and stained and counterstained with 2% (v/v) uranyl acetate. Finally, the samples were observed under a Carl Zeiss SMT LIBRA 120 PLUS TEM microscope. The size of the nanoparticles was measured using the microscope's own measuring scale and Image J 1.41 software.

### **Nanoparticle tracking analysis**

Distribution, size, and concentration of the EVs samples of *T. cruzi* were determined by measuring the rate of Brownian motion according to the particle size in a Nanosight NS300 (Malvern Instruments, UK). For this purpose, EVs samples were diluted in sterile filtered PBS up to 1 mL and loaded into the high-sensitivity EMCCD chamber for excitation with a 405 nm laser available on the instrument. The Brownian motion images were recorded in three 60-second videos on a camera and analyzed for each of the samples using the instrument's image analysis software, NTA 2.3 (NanoSight, UK). Measurement conditions were manually adjusted for both shutter, gain, brightness and threshold, all measured at 25 °C. The mean size distribution was calculated as the average of three independent size distributions.

### **Preparation of polyclonal anti-*T. cruzi* antibodies and separation of sialylated and non-sialylated IgGs**

- **Preparation of polyclonal anti *T. cruzi* antibodies**

Five male BALB/c mice were immunized with 20 µg per dose of a total trypomastigote extract of *T. cruzi* Pan4 to produce a polyclonal anti-*T. cruzi* antibody. The parasite extract was

obtained from  $10^9$  trypomastigotes from cell cultures previously washed and concentrated by centrifugation as described above. The pellet containing the parasites was subjected to three cycles of freezing at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and slow thawing, and then sonicated in a Branson SLP sonifier (10 s intervals and 10 s pauses, for 2 min). The protein concentration of the lysate was quantified using the microBCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and aliquoted to  $20\text{ }\mu\text{g}$  per  $250\text{ }\mu\text{L}$  of PBS.

For the first immunization, the antigen suspension was prepared by mixing it with Freund's complete adjuvant (Sigma, USA) in a 1:1 ratio (final volume:  $500\text{ }\mu\text{L}$ ). Freund's incomplete adjuvant (Sigma, USA) was used for subsequent immunizations up to a total of 7 (one per week). The antibody titers of the serum samples were determined weekly after the first two immunizations by indirect ELISA and, at the end of the immunization period (8 weeks) mice were euthanized under isoflurane. Whole blood samples were obtained by cardiac puncture and sera were collected using BD Microtainers® (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Final antibody titers were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described elsewhere.

- **Electrophoretic separation of proteins and Western blot**

Proteins from EVs samples of *T. cruzi* were precipitated in acetone at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight. The precipitated samples were centrifuged at  $13,000\text{ } \times g$  for 10 minutes at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and washed twice with cold acetone. Finally, the acetone was evaporated

under a nitrogen stream and the precipitated proteins were quantified using the MicroBCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). For electrophoresis, 30 µg of proteins of EVs were loaded onto 12% SDS-PAGE gels and then transferred to PVDF membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) in a Turbo Trans-Blot transfer system (BioRad, Hercules, CA, USA). The membranes were immersed in blocking buffer (PBS, 0.1% Tween 20 and 4% nonfat dry milk) and incubated for 2 hours at 4 °C and under gentle shaking. The blocked membranes were then incubated with a 1:1,000 dilution of the polyclonal anti-*T. cruzi* antibodies overnight at 4 °C. After this incubation, the membranes were washed and incubated with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1: 1,000) (Dako Agilent Pathology Solutions, USA) for 1 hour at room temperature. The detected bands were visualized using Clarity ECL Western Substrate (BioRad, Hercules, CA, USA) on a ChemiDoc Imaging system (BioRad, Hercules, CA, USA).

- **Purification of sialylated and non-sialylated IgGs**

IgGs anti-*T. cruzi* were purified from polyclonal anti-*T. cruzi* antibodies using Melon gel chromatography gel monoclonal IgG purification kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions. Microcolumns were prepared by placing 500 µL of gel in an empty cartridge that was centrifuged at 3,000 x g for 1 minute to densify the gel, followed by two washes with 300 µL of the purification buffer provided with the kit. Then, 0.5 mL of serum with polyclonal antibodies were diluted 1:10 with the purification buffer, added to the column and

incubated for 5 minutes under agitation. The column was then centrifuged to collect the purified IgGs present in the elution.

In order to separate sialylated from non-sialylated IgGs, an affinity chromatography using minicolumns coupled to Sambucus nigra lectin (SNA, EBL) agarose (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) was performed. For this purpose, 500  $\mu$ L of Sambucus nigra lectin (SNA, EBL)-agarose were placed in an empty cartridge (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and submitted to a centrifugation step at 3,000 x g for 1 minute to densify the matrix of these columns. Then, 3 washing steps of the column with PBS, followed by 3 washing steps with Hank's solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) were performed. IgGs previously purified using the Melon Gel Chromatography Purification Kit were diluted in Hank's solution at a 1:1 ratio and added to the lectin for 10 minutes at room temperature with gentle agitation. Thereafter, the column was centrifuged at 3,000 x g for 1 minute and the eluate (containing non-sialylated IgGs) was collected. The column was washed 4 times with PBS, collecting the eluate after each step.

Elution of sialylated IgGs was performed by adding 2 volumes of 0.5 M lactose in PBS, followed by further washing with 2 volumes of 0.5 M lactose and 0.2 M acetic acid in PBS; once the sialylated IgGs was eluted, the pH of the samples was neutralized to 7.2 by adding Tris base. Both sialylated and non-sialylated IgGs were dialyzed against 0.1 M ammonium acetate for 24 hours with at least 4 changes of the dialysis fluid. The protein concentration of the samples was quantified using the



microBCA protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) and after quantification, the samples were aliquoted and lyophilized. Before use, lyophilized IgGs were resuspended in sterile PBS. Both the purity of the samples and whether or not they were sialylated IgGs were assessed by 12.5% SDS-PAGE electrophoresis followed by Western blot.

For Western blot, 10 µg of sialylated and non-sialylated IgGs obtained as previously described were separated by 12.5% SDS-PAGE gel electrophoresis. After electrophoretic separation, transference to PVDF membranes (BioRad, Hercules, CA, USA) was performed using a Trans-Blot turbo transfer system (BioRad, Hercules, CA, USA). The membranes were then blocked and washed as previously described, and incubation with 5 µg/mL Sambucus nigra biotin-linked lectin (SNA, EBL) (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) for 25 minutes at room temperature was performed. After this incubation, the membranes were washed 6 times in PBS-Tween 20 0.1% and then incubated with streptavidin-HRP (1:8000) for 45 minutes at room temperature. Finally, the membranes were washed 6 times with PBS-Tween 20 0.1% and visualized on a ChemiDoc MP imaging system (BioRad, Hercules, CA, USA) (Figure 1C).

- **Recognition of EVs proteins by IgGs anti-*T. cruzi***

To evaluate the recognition and binding of proteins in EVs by polyclonal anti-*T. cruzi* IgGs, 30 µg of EVs were resolved by SDS-PAGE electrophoresis and analyzed by Western blot, as previously described. For this purpose, the analyses were performed using the anti-*T. cruzi* IgGs separated from the

polyclonal anti-*T. cruzi* antibodies produced in mice (1:100). Goat anti-mouse IgGs conjugated with peroxidase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (1: 1,000) were used as secondary antibodies and visualization was performed in a ChemiDoc MP imaging system (BioRad, Hercules, CA, USA).

- **Preparation of immune complexes (ICs) EVs - IgGs anti-*T. cruzi* and inoculation of mice**

To carry out the formation of immune complexes *in vitro* using EVs of trypomastigotes and IgGs anti-*T. cruzi*, a methodology previously described was applied, and the amount of proteins of EVs necessary to carry out the experiment was set at a rate of 38 µg of EVs per mouse (equivalent to approximately  $5.087 \times 10^8$  EVs) (Retana Moreira et al., 2019).

Incubation of EVs and anti-*T. cruzi* IgGs (sialylated and non-sialylated IgGs) was performed under orbital shaking (10 rotations per minute) at 37 °C for 1 hour. Thereafter, the samples were washed 3 times by ultracentrifugation in sterile-filtered PBS plus protease inhibitors (Roche, Switzerland) to remove unbound immunoglobulins and each pellet was then resuspended in 100 µL of sterile-filtered PBS and stored at 4 °C until inoculation into the animals. An aliquot of the immune complexes obtained was examined by atomic force microscopy (Figure 2).

For the intraperitoneal inoculation of mice with the previously prepared stimuli, 4 animals were used for each batch, which consisted of 250 µL of PBS containing an equivalent amount of proteins from each of the different fractions of the purified IgGs (sialylated or non-sialylated IgGs).

### **Atomic force microscopy**

To visualize the binding of the anti-*T. cruzi* IgGs to the purified EVs released by trypomastigotes, atomic force microscopy analyses were performed, following the methodology previously described (Retana Moreira, 2021). For these experiments, 8  $\mu$ L of the suspension of ICs formed *in vitro* (EVs-IgGs) were deposited onto the moscovite mica slide that served as the substrate, and the samples were incubated for 15 minutes. Then, 3 washing steps with milliQ ultrapure water (Millipore, Burlington, MA, USA) were performed and the samples were dried under a gentle stream of argon prior to the visualization.

Atomic force microscopy analysis was performed using non-contact and tapping modes, in NX-20 equipment (Park Systems, Suwon, Korea) and images were acquired and processed as described by Retana Moreira et al. (2021), using the XEI software (Park Systems, Suwon, Korea). Samples of purified EVs were also analyzed.

### **Flow cytometry analysis for macrophage separation**

For these experiments, six-week-old female C57BL/6 wild-type mice maintained under pathogen-free conditions were used and six different groups were established and inoculated with a final volume of 250  $\mu$ L of the following preparations: 1) EVs (38  $\mu$ g/mouse), 2) immune complexes EVs - sialylated IgGs, 3) immune complexes EVs - non-sialylated IgGs, 4) trypomastigotes derived from cell cultures and resuspended in PBS ( $10^6$  parasites), and 5) LPS (10  $\mu$ g). The last two preparations were included as positive controls, as described

previously (A. dos A. Cassado et al., 2011). A final batch of mice inoculated with 250  $\mu$ L of PBS was also included as negative control. All inoculations were performed intraperitoneally in a final volume of 250  $\mu$ L in PBS.

After 48 h of stimulation of the mice with the preparations previously described, the mice were anesthetized in isoflurane atmosphere, euthanized by cervical dislocation and peritoneal exudate cells (PEC) were collected by washing the peritoneal cavity of each animal with 5 mL of a cold 0.85 mM EDTA solution in sterile PBS. Peritoneal cells were centrifuged at 1,000 x g for 10 minutes at 4 °C and the pellets obtained from centrifugation were resuspended in ACK lysis buffer (0.15M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01M  $\text{KHCO}_3$ , 0.1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH 7.2), where they were held for 5 minutes to lyse red blood cells contaminating the peritoneal exudate. After this lysis step, the cells were centrifuged at 1,000 x g for 5 minutes and the pellets were resuspended in 200  $\mu$ L of PBS.

The cell suspensions were incubated for 20 minutes in the dark at room temperature with the labeled monoclonal antibodies included in Table S1. Incubations with each antibody were performed in separate and after each incubation, the cells were centrifuged at 1,000 x g for 5 minutes, unbound antibodies were removed and two washes with 500  $\mu$ L sterile PBS were performed. With this panel of antibodies, the frequency of two different subpopulations of peritoneal macrophages was measured and a sorting separation of these populations into large peritoneal macrophages or LPM (CD19<sup>-</sup>, CD11c<sup>-</sup>, CD11b<sup>hi</sup>,

F4/80hi and MHCIIlo) and small peritoneal macrophages or SPM (CD19-, CD11c-, CD11blo, F4/80lo and MHCIIhi) was carried out (Bou Ghosn et al., 2010; A. A. Cassado et al., 2015). Briefly, for this separation and after the incubation with all the antibodies of the panel, singlets were chosen. Then, viable B cells were removed, selecting CD19- cells. Dendritic cells were also removed gating CD11c- cells and finally, LPM and SPM were selected according to the expression levels of CD11b and F4/80.

- **Cytokine expression analyses in large and small peritoneal macrophages**

After the separation and purification of both macrophage subpopulations, the cell suspensions were centrifuged at 1,000 x g for 10 minutes and the cell pellets were lysed and homogenized with TRIzol reagent (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) for RNA purification. After the extractions, incubation with DNase I, RNase-free (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) was performed according to the manufacturer's recommendations, and the absence of gDNA was confirmed by the absence of a positive amplicon in PCR amplification for the actin gene.

Once the RNAs were purified and quantified, the expression of cytokines and markers (*IL-1 $\beta$* , *IL-2*, *IL-12*, *IL-18*, *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *G-CSF*, *IL-6*, *IL-15*, *IL-10*, *TGF- $\beta$* , *IL-17*, *IL-38*, and nitric oxide synthase (*NOS*) was analyzed by RT-qPCR, using the iTaq™ universal SYBR® Green one-step universal SYBR® kit (BioRad, Hercules, CA, USA), employing *gapdh* as the reference gene.

The sequences of the primers employed in this analysis are listed in Table S2; primer sequences were located across exon–exon borders, avoiding any interspecifically and intraspecifically variable positions. Moreover, a calibration curve was performed according to Gomez-Samblas et al. (Gomez-Samblas et al., 2018) to calculate the efficiency of each pair of primers.

Reactions were performed in a CFX-96 RT-PCR system (BioRad, Hercules, CA, USA), using a final volume of 10  $\mu$ L, which included 300 nM of each primer and 100 ng of RNA per reaction. The thermal cycling conditions consisted of retrotranscription at 50 °C for 10 minutes, followed by an enzymatic activation step and DNA denaturation at 95 °C for 1 minute, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 10 seconds and an annealing and extension step at 60 °C for 30 seconds, followed by plate reading. At the end of the RT-qPCR reactions, a melting gradient was applied from 65 °C to 95 °C in 0.5 °C increments. Cytokine expression was also normalized against *gapdh* and the negative control (PBS-injected mice).

## Results

### Isolation and characterization of EVs

Extracellular vesicles of trypomastigotes of *T. cruzi* were obtained following a sequential process of differential centrifugation, filtration and ultracentrifugation, a method previously employed by our research group (Retana Moreira et al., 2019, 2021). EVs isolation and characterization was performed following the Minimal Information for the Study of Extracellular Vesicles (MISEV) guidelines (Théry et al., 2018),

recommended by the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) for all articles involving such vesicles. Transmission electron microscopy of the samples observed by negative staining, nanoparticle tracking analysis and atomic force confirmed the presence of vesicles of a size compatible with exosomes and smaller ectosomes of the infecting stage of the parasite, described by our group in previous publications (Retana Moreira et al., 2021) (Figure S1). In particular, TEM revealed a mean size of vesicles of 46.3 nm (median: 45.7 nm) (Figure S1 A) and majority peaks of vesicles corresponding to 42 and 52 nm was observed using NTA (Figure S1 B). In all of the analyses, aggregations of EVs were observed, especially in TEM and AFM (Figures S1 A and S1 C).

Western blot analysis using an antibody against cruzipain revealed the presence of bands of 35 kDa – 70 kDa, corresponding to this *T. cruzi*-specific enzyme in EVs (Figure S1 D).

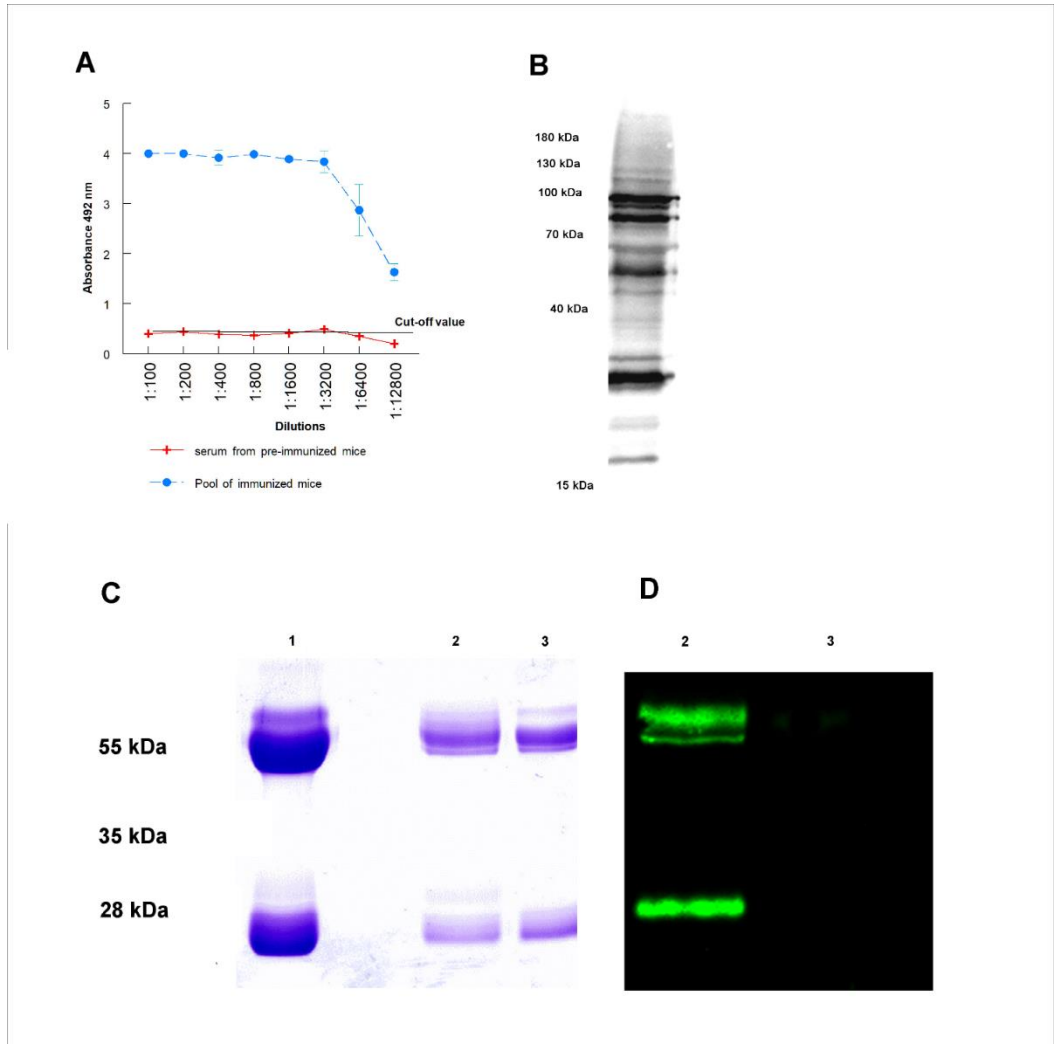
### **Purification of sialylated and non-sialylated IgGs and formation of immune complexes EVs – IgGs**

The success in mice immunization with a total extract of trypomastigotes of *T. cruzi* and the consequent purification IgGs anti-*T. cruzi* from sera from infected mice is presented in Figure 1. Figure 1 A shows antibody titers obtained by immunization of mice with the total extract of trypomastigotes obtained from cell cultures. From the ELISA, the 1: 12,800 dilution of the hyperimmune serum revealed an absorbance 3 times higher than that the titer of sera from non-immunized mice, in which the cut-off value was obtained. Figure 1 B shows the antigenic

recognition of antigens of *T. cruzi* in the total extract of trypomastigotes by sera of immunized mice using Western blot.

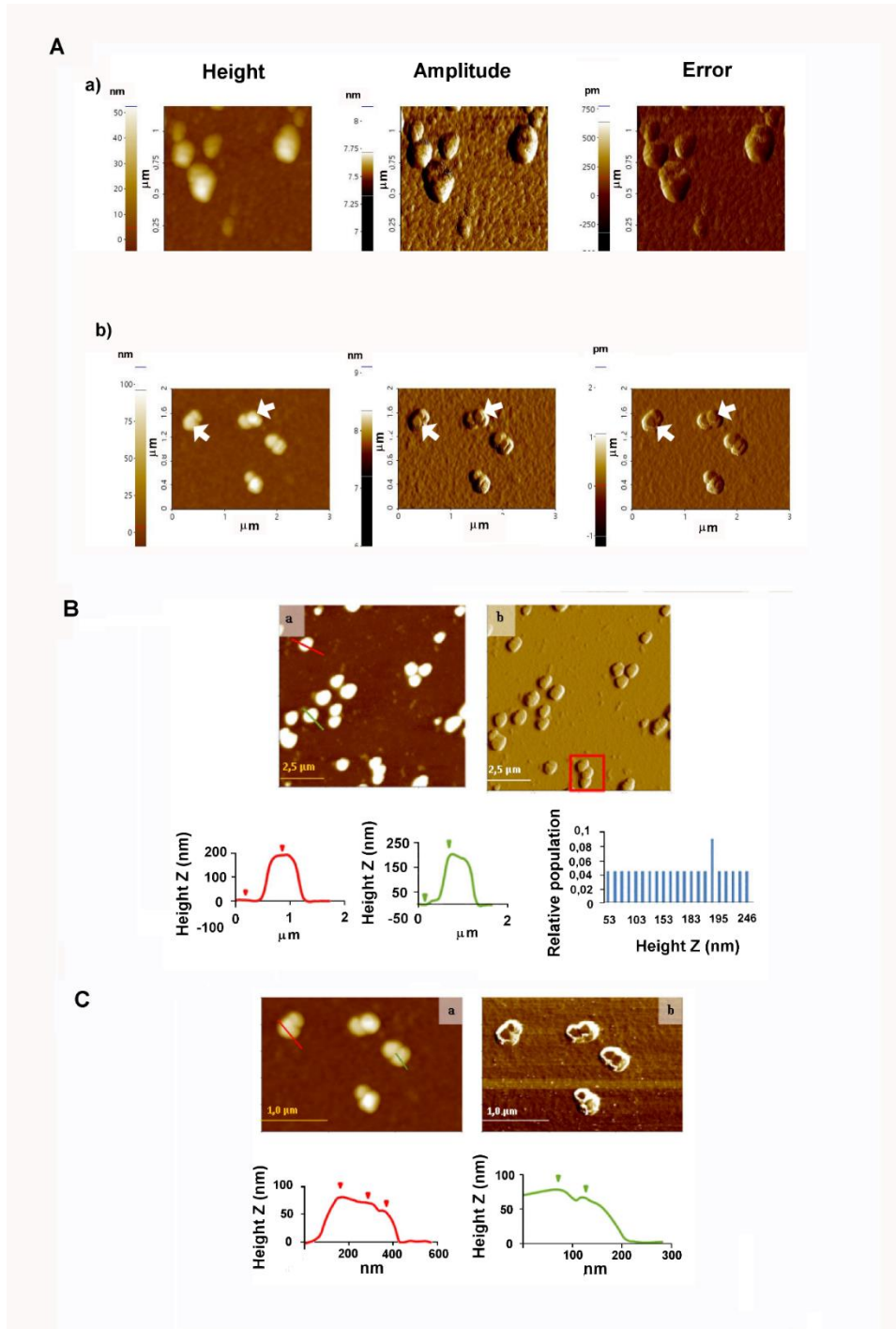
Figure 1 C the Lane 1 shows the result of the purification of total IgGs from sera using Melon gel chromatography. In this Figure, bands corresponding to the heavy and light chains of the purified IgGs are observed. Moreover, affinity chromatography with *Sambucus nigra* lectin was performed to separate sialylated from non-sialylated IgGs; results from this process are shown in Figure 1 C (2 and 3 lanes. In this Figure, lane 2 corresponds to sialylated-IgGs, which were retained and subsequently eluted with 0.5 M lactose, while lane 3 corresponds to non-sialylated-IgGs that were not retained in the previous affinity chromatography. Figure 1 D shows a Western blot that confirms the proper purification of sialylated and non-sialylated IgGs, following the protocol described in Material and Methods section.





**Figure 1.** Purification of IgGs anti *T. cruzi* after the immunization of mice: A) antibody titers obtained against total proteins of trypomastigotes of *T. cruzi*; B) antibody recognition of total proteins from a lysate of trypomastigotes by Western blot; C) SDS-PAGE electrophoresis of purified immunoglobulins: purification of total IgGs by Melon gel chromatography (1), sialylated (2) and non-sialylated IgGs (3) after affinity chromatography using Sambucus nigra lectin; D) Western blot analysis using biotinylated Sambucus nigra lectin and revealed with streptavidin HRP: sialylated (2) and non-sialylated IgGs (3).

AFM was also employed to study the morphology and distribution of *T. cruzi* EVs and those with which immune complexes were formed by incubating purified IgGs from anti-*T. cruzi* sera with the purified EVs. Once the ICs resulting from this incubation were formed, they were purified and washed by ultracentrifugation, and non-covalently immobilized on the mica sheet for subsequent observation by AFM. The results obtained are shown in Figure 2, which also confirmed the presence and integrity of the vesicles. For EVs, homogeneous particles of 20-50 nm were observed (Figure 2 A, a). In the case of the immune complexes (Figure 2 A, B), larger structures were observed both in the non-contact (Figure 2 B) and tapping modes (Figure 2 C), suggesting that they could correspond to more than one IgG aggregated with one or more different EVs, as length values between 0.8  $\mu\text{m}$  and 1.5  $\mu\text{m}$  were obtained (Figure 2 B, red square); however, length values from 0.35 to 1.35  $\mu\text{m}$  and height values from 50 to 250 nm prevailed. Figure 2 C shows immune complexes of different globular shapes and sizes, with length values from 0.175 to 1.8  $\mu\text{m}$  and height values from 50 to 246 nm. In the same Figure 2 C, changes in the profile lines are evident, which can be interpreted as changes in the heights of the identified particles.



**Figure 2.** Atomic force microscopy analyses of EVs secreted by trypanostigotes of *T. cruzi* (a) and (b) immune complexes EVs-IgGs anti *T.*

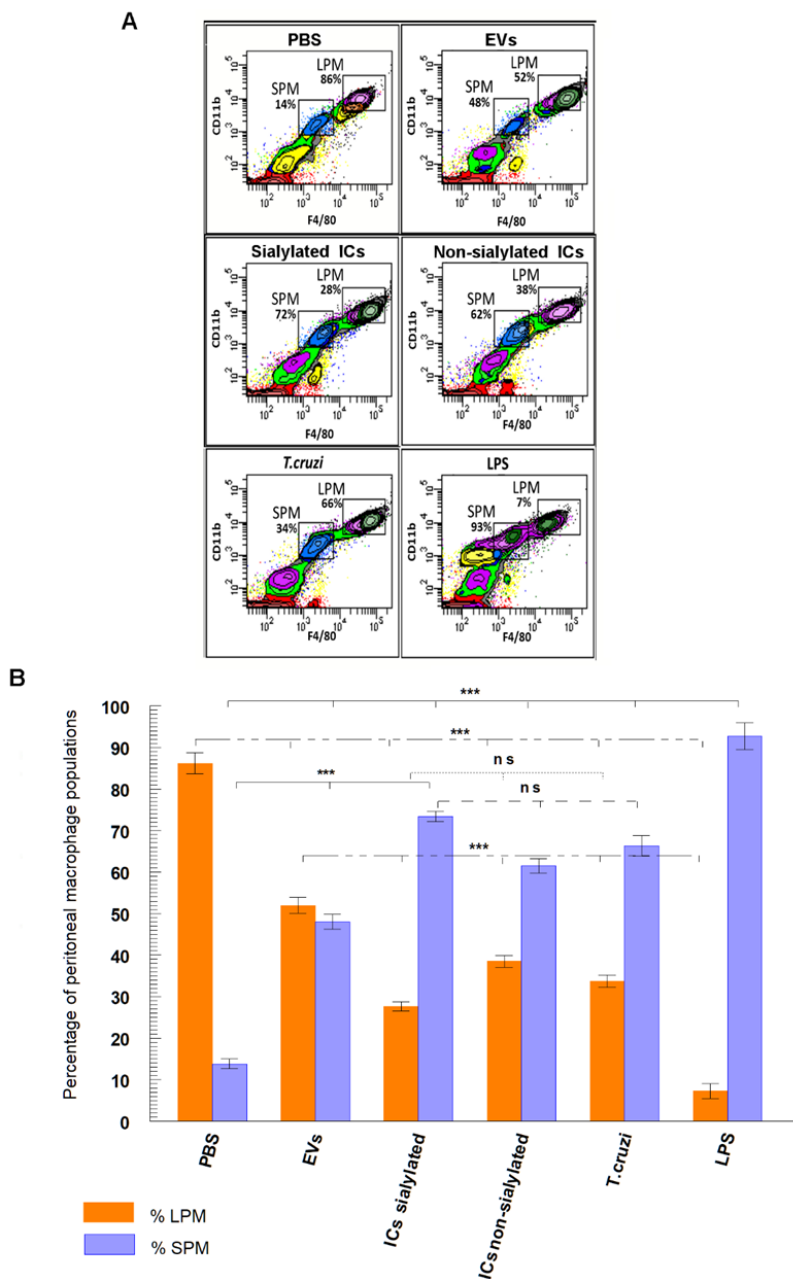
*cruzi* (A). Non-contact (B) and tapping (C) modes were employed for the analysis of ICs. In C, the formation of ICs as a result of the binding of IgGs to EVs is evidenced by changes in the height profile as a result of that binding. Graphs show profile lines that correspond to topography images, in which changes in the profile are observed as changes in the heights of the particles identified (for the red profile: first step of 8.167 nm and second step of 10.082 nm in height; for the green profile: Z height of 11.220 nm).

### **Flow cytometry analysis for macrophage separation**

Figures S6 – S11 show the separation of cell subpopulations in the peritoneal cavity of mice stimulated with different preparations using sorter flow cytometry. Results include both the number of events and the percentages of cell subpopulations 48 hours after the inoculation with the samples included in this study: EVs, immune complexes formed by the incubation of EVs of *T. cruzi* with sialylated or non-sialylated IgGs, LPS and trypomastigotes of *T. cruzi* (positive controls) and PBS (negative control). Results regarding the number of cells obtained for each stimulation are shown in Table S3. The same figures (Figures S6 – S11) also show how cell subpopulations were selected using antibodies and flow cytometry.

Figure 3 A shows the final plots of the different macrophage subpopulations recovered from the peritoneal cavity of the mice, 48 hours after the stimulation with the samples described above. In Figure 3 B, macrophage subpopulations recovered after mice stimulation with the samples, as well as the statistical significance of the difference in the numbers of small and large peritoneal macrophages are presented in a bar graph. Results show that in the peritoneal cavity of mice inoculated with PBS

(negative control), there is a larger population of LPM (86.2%) compared to 13.8% of SPM, while for LPS (positive control), the percentage of LPM is drastically reduced to 7.3% and SPM increased to 92.7%. When mice were stimulated with trypomastigotes of *T. cruzi*, the percentage of LPM decreased to 33.7% as compared to the negative control, while SPM reached 66.3%. However, when mice were stimulated with EVs secreted by this stage of the parasite, percentages of LPM and SPM tended to equalize (52% for LPM and 48% for SPM). A percentage of LPM significantly reduced with respect to the percentage of LPM obtained when mice were inoculated with immunoglobulin-free EVs (27.6%); for SPM, the percentage of cells reached 73.4% of the total population of macrophages. Finally, mice stimulated with ICs formed by the incubation of EVs with non-sialylated IgGs reached macrophage percentages of 38.5% for LPM and 61.5% for SPM.



**Figure 3.** Separation (A) and percentage (B) of macrophage subpopulations (small and large peritoneal macrophages) collected from the peritoneal cavity

of mice after different stimuli using flow cytometry: PBS, EVs (extracellular vesicles shed by trypomastigotes of *T. cruzi*), sialylated ICs (EVs - IgGs anti *T. cruzi* retained after affinity chromatography using Sambucus nigra lectin), non-sialylated ICs (EVs - IgGs not retained after affinity chromatography using Sambucus nigra lectin), *T. cruzi* (trypomastigotes) and LPS. The statistical test used was the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ).

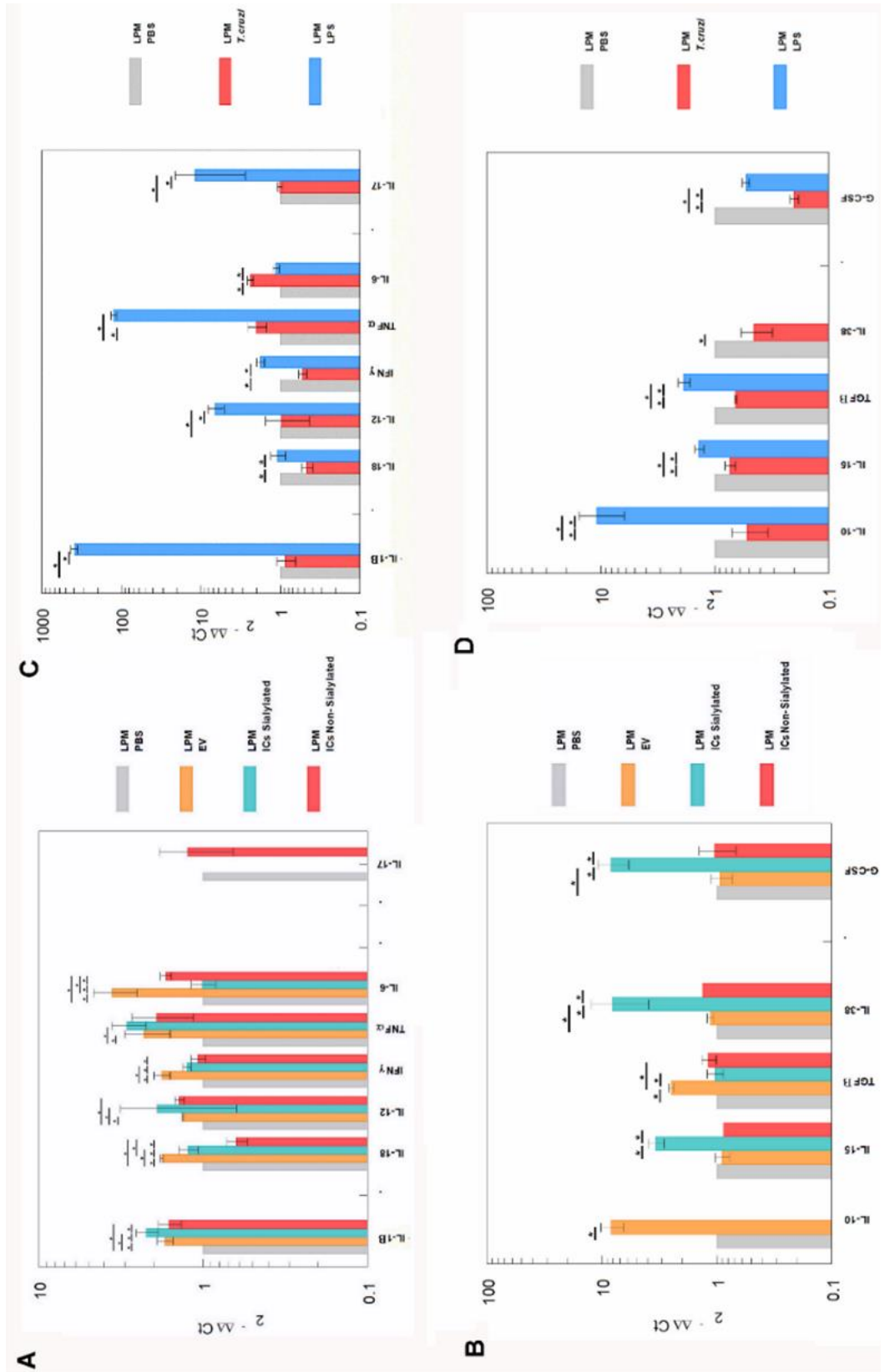
### **Cytokine expression analyses in large and small peritoneal macrophages stimulated with EVs and immune complexes EVs - IgGs anti-*T. cruzi***

The differential expression of interleukins by the LPM and SPM populations, recovered from the peritoneal cavity of mice after the 48-hour stimulation with EVs and ICs and separated by the sorter, is shown in Figures 4 and 5 A. Figure 4 A and B shows the cytokine expression in LPM after the stimulation with EVs or after forming immune complexes with sialylated or non-sialylated IgGs. In, Figure 4 C and D shows the expression levels of the non-inflammatory interleukins in peritoneal macrophages after the stimulation with trypomastigotes of *T. cruzi* or LPS (positive controls). The expression of Th1 inflammatory interleukins reflects how, in general, the stimulation with EVs induces a higher expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-18 and IL-6. As can be observed in Figure 4 A, there is an increase in the IL-1 $\beta$  expression in macrophages from the 3 conditions in which EVs of *T. cruzi* were used. This is followed by the stimulation produced by the immune complexes formed using sialylated IgGs, where an increased expression of IL-12 and TNF- $\alpha$  is induced. Moreover, the IFN- $\gamma$ , IL1B and IL12 interleukins were upregulated when the peritoneal cavity of mice was stimulated by LPS (Figure 4 C). For the case of trypomastigotes, expression

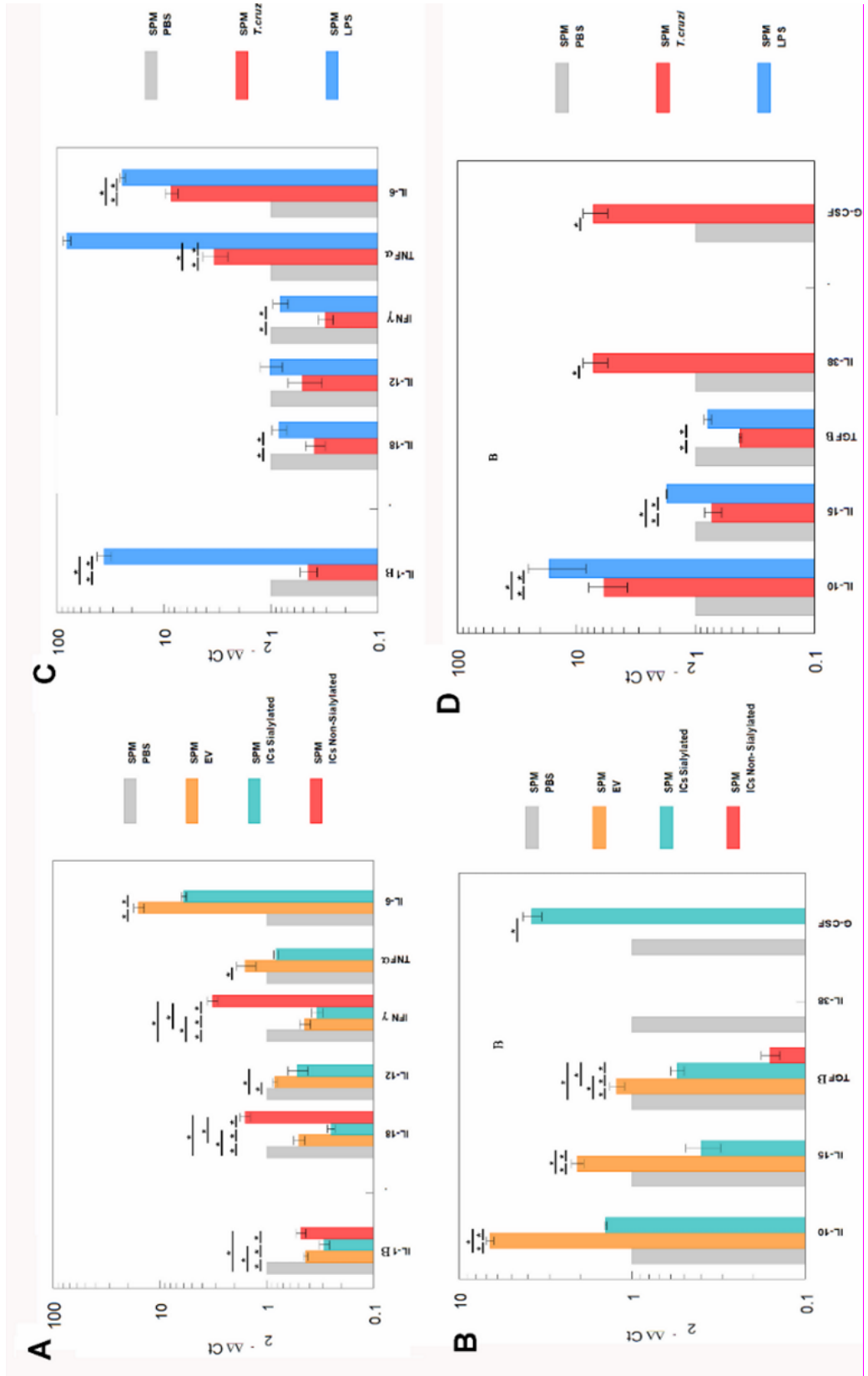
of IL-6 and IL-18 resulted higher when compared to PBS control. Regarding IL-17 expression, LPM showed an increased expression level after stimulation with LPS, Figure 4 C.

Figure 5 A and B shows the relative expression levels of inflammatory and non-inflammatory interleukins produced by SPM after stimulation with EVs or immune complexes formed by sialylated or non-sialylated IgGs. Figure 5 C shows the expression levels of inflammatory interleukins produced by SPM after stimulation with trypomastigote forms of the parasite or with LPS. Figure 5 D shows the expression levels of non-inflammatory interleukins produced by sorter-purified SPM after stimulation of the peritoneal cavity with *T. cruzi* forms or with LPS (stimulation control). For IL-10, the highest level of expression occurred after the injection of the peritoneal cavity with EVs and in stimulation control experiments with LPS (Figure 5 B and D, respectively). Other cytokines such as IL-15, IL-38 or G-CSF, also presented maximum expression levels after the stimulation with immune complexes formed with sialylated IgGs.





**Figure 4.** Relative interleukin expression of the LPM subpopulation after the stimuli of mice with EVs of *T. cruzi*, as well as sialylated and non-sialylated ICs (EVs – IgGs anti-*T. cruzi*) versus controls stimulated with trypomastigote forms of the parasite or LPS. Figure 4 A, relative expression levels of inflammatory interleukins produced by LPM after stimulation with EVs or immune complexes formed by sialylated or non-sialylated IgGs. Figure 4 B shows the expression levels of non-inflammatory interleukins produced by LPM after stimulation with EVs or ICs formed by sialylated or non-sialylated IgGs. Figure 4 C shows the expression levels of inflammatory interleukins produced by LPM after stimulation with trypomastigote forms of the parasite or with LPS (stimulation controls). Figure 4 D shows the expression levels of non-inflammatory interleukins produced by sorter-purified LPM after stimulation of the peritoneal cavity with *T. cruzi* forms or with LPS (stimulation controls). The statistical test used was the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. (\*=  $p < 0.05$ )

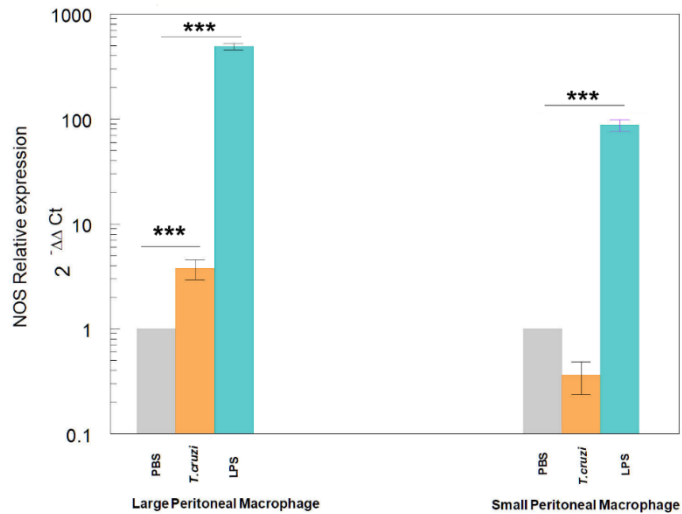


**Figure 5.** Relative interleukin expression by SPM subpopulation after the stimuli of mice with EVs of *T. cruzi*, as well as sialylated and non-sialylated ICs (EVs – IgGs anti-*T. cruzi*) versus control stimulated with trypomastigote forms of the parasite or LPS. Figure 5 A, relative expression levels of inflammatory interleukins produced by SPM after stimulation with EVs or immune complexes formed by sialylated or non-sialylated IgGs. Figure 5 B shows the expression levels of non-inflammatory interleukins produced by SPM after stimulation with EVs or ICs formed by sialylated or non-sialylated IgGs. Figure 5 C shows the expression levels of inflammatory interleukins produced by SPM after stimulation with trypomastigote forms of the parasite or with LPS (stimulation controls). Figure 5 D shows the expression levels of non-inflammatory interleukins produced by sorter-purified SPM after stimulation of the peritoneal cavity with *T. cruzi* forms or with LPS (stimulation control). The statistical test used was the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. (\*=  $p < 0.05$ )

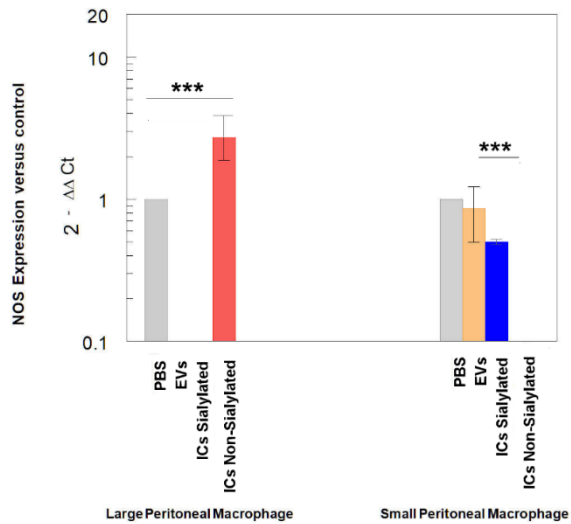
The SPM subpopulation underwent significant variations after the different stimuli (Figure 5), either with the ICs or after the challenge with trypomastigotes or LPS. In this sense, the highest expression levels of IFN- $\gamma$  were obtained after the stimulation of these cells with the immune complexes with non-sialylated IgGs, while stimulation with EVs of the parasite induced maximal expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 (Figure 5 A and C), IL-10, IL-15 and TGF- $\beta$  (Figure 5 B and D), the stimulation with immune complexes with sialylated IgGs induced increased expression of both the inflammatory interleukin IL-6 (Figure 5 A) and the regulatory interleukins IL-10 and G-CSF (Figure 5 B). For the latter, expression was not induced by either EVs or non-sialylated immune complexes, and in the case of control experiments, expression of G-CSF was only achieved when the stimulation was performed with trypomastigotes of *T. cruzi*

(Figure 5 D). The SPM did not express IL-17 in any case, and expression levels for interleukin IL-38 were obtained only when the stimulation was performed in the control experiment after the inoculation with trypomastigotes (Figure 5 D).

A



B



**Figure 6.** Relative expression of nitric oxide synthase (NOS) in SPM and LPM subpopulations after the stimuli of mice with: trypomastigotes of *T. cruzi* and LPS (A), and EVs of *T. cruzi* and sialylated or non-sialylated ICs. The

statistical test used was the Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test. (\*\*\*) =  $p < 0.001$ )

Finally, the expression of NOS by large and small peritoneal macrophages of the control treatments is shown in Figure 6, where the stimulation with LPS or trypomastigotes of *T. cruzi* induces the expression of NOS in LPM at a higher level than SPM, which even showed lower expression levels than macrophages obtained after the injection of mice with PBS. Injection of either EVs or the two types of immune complexes in SPM did not induce NOS expression levels higher than the PBS control under our experimental conditions.

## Discussion

Macrophages are considered to be part of the first barrier to prevent infections, acting as antigen-presenting cells to CD4+ T lymphocytes or as phagocytic cells of previously opsonized antigens. During an infection, monocytes/macrophages acquire the M1 phenotype (IL-10-, IL-12+, NOS+, CXCL9+), which are the major effector cells for the first line of host antibacterial defense (L. Wang et al., 2019). On the other hand, M2 macrophages refer to alternatively activated macrophages and can be polarized by various stimulatory factors; moreover, different M2 macrophage subtypes can be induced by different stimulatory factors (Gordon, 2003). In 2008, Mosser and Edwards proposed that the classification of macrophages could be based on the functions in which they participate, including host defense, wound healing, and immune regulation (Mosser & Edwards, 2008). From subtypes of M2 macrophages, M2a (also

referred to as wound healing macrophages) are induced by IL-4 and IL-13, and express high levels of mannose receptor (MR, also referred to as CD206), IL-1 decoy receptor (IL-R) and CCL17, which promote the secretion of pro-fibrotic factors such as TGF- $\beta$ , insulin-like growth factor (IGF) and fibronectin to contribute to tissue repair (L. Wang et al., 2019). On the other hand, bacteria, viruses, and some protozoan parasites like *Leishmania* can increase the number and proportion of M2b macrophages in the peritoneal cavity (IL-10+, IL-12-, IL-6+, TNF- $\alpha$ +, CD11b+, MHCII+) (Lefèvre et al., 2013; X. Zhao et al., 2014), which, despite their high phagocytic capacity, are not the main cells responsible for killing bacteria (Atri et al., 2018).

The secretion of EVs by trypomastigotes of *T. cruzi* favors the invasion process to the host cell and modulates the immune response so that parasitisation can be successful. In a recent publication, Cortes Serra et al. (2022) review and discuss the role of EVs secreted during a *T. cruzi* infection and their immunomodulatory properties (Cortes-Serra et al., 2022). It is also well known that EVs of the parasite induce physiological changes, including increases in the intracellular calcium concentration and modifications at the cytoskeletal level such as actin depolymerization (Retana Moreira et al., 2019), which could maybe alter macrophage migration and their phagocytic capacity. Moreover, EVs released by THP-1 cells that are in contact with the parasite are also able to modulate the immune response of the host by inhibiting C3 convertase; complement system inhibition is also achieved directly by EVs released by the parasite (Díaz Lozano et al., 2017).



The role of EVs of *T. cruzi* in inducing the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) *in vivo*, as well as the production of NO by murine macrophages after the interaction with TLR2 has been previously reported (Cronemberger-Andrade et al., 2020; Nogueira et al., 2015). Moreover, in 2018, Lovo Martins et al. revealed that macrophages from the bone marrow stimulated with EVs of the parasite increased prostaglandin E2 (PGE2) production and the formation of lipid bodies; the increase in PGE2 has been related to an augmented susceptibility of the host to *T. cruzi* invasion (D'Avila et al., 2011; Lovo-Martins et al., 2018). Moreover, PGE2 can also affect the antibody production by blocking the transformation of B lymphocytes into plasmatic cells, and inhibit the role of T cytotoxic cells and Th1 lymphocyte development (Kalinski, 2012). The ability of EVs of the parasite in inducing the release of proinflammatory cytokines has also been confirmed using *in vitro* models, in which the secretion of nitric oxide (NO) by THP-1 macrophages was also confirmed (Cronemberger-Andrade et al., 2020). Besides, Nogueira et al. (2015) analyzed the immune response induced by these vesicles in peritoneal macrophages from C57BL/6 mice and their results coincide with increased expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in LPM of our study. On the other hand, it has also been described how the stimulation of animals with EVs of *T. cruzi* prior to the infection with trypomastigotes induced a decrease in NO production in plasma, as well as the production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in spleen cells, but an increase in IL-4 and IL-10 in splenocytes and macrophages that induced high parasitemia and the death of the mice. It was

confirmed in this study that peritoneal cells also synthesize IL-12, TNF- $\alpha$  and NO after EVs stimulation (Lovo-Martins et al., 2018; Trocoli Torrecilhas et al., 2009).

Extracellular vesicles released by *T. cruzi* contain a repertoire of key components that are also capable of stimulating TLR (Bafica et al., 2006) as it happens with the whole parasite. The cargo of these EVs includes nucleic acids, proteins with protease activity like GP63 and serine proteases, and GPI-anchored members of the large mucin family that include *trans*-sialidases, all of them capable of activating TLR2 and TLR9 and induce a pro-inflammatory response (Tarleton, 2007). The role of *trans*-sialidases in EVs over cell physiology and the modulation of the immune response has also been studied by our research group, and it is likely that these enzymes, capable of transferring sialic acid from the host cell to mucins of the parasite might be responsible, at least in part, for lymphoid cell modulation (Retana Moreira et al., 2021).

In this work, the exposure of extracellular vesicles of trypomastigotes of *T. cruzi* to the immune system could be considered an approach to the early stage of the infection (acute phase of the disease), while the injection of immune complexes EVs - IgGs anti *T. cruzi* could simulate the chronic stage, in which most of the circulating anti *T. cruzi* immunoglobulins are IgGs which must participate in the formation of these complexes, as previously reported by our group (Díaz Lozano et al., 2017). Results obtained under our experimental conditions show that the stimulation of C57BL/6 mice with trypomastigotes of the

parasite and LPS triggered an increase in the proportion of SPM when compared to the negative control (PBS-stimulated mice) (Figure 3 B); similar results as those obtained by Cassado et al. in 2015 (A. A. Cassado et al., 2015). When the stimulation was performed with EVs of the parasite, an increase in the proportion of SPM was also observed, but in a minor proportion as for trypomastigotes or LPS. However, when mice were challenged with both types of immune complexes (sialylated and non-sialylated ICs), the proportion of SPM was significantly higher than when the challenge was performed with EVs, which could suggest that even when EVs are an immunologic stimulus capable of increasing the SPM population, surface components of the vesicles that are not blocked by the Fab region of IgGs anti-*T. cruzi* are likely to suppress the stimulatory response in lymphoid cells of the peritoneal cavity of mice, which would impede the recruitment of circulating monocytes to the peritoneal cavity.

The separation of SPM and LPM subpopulations obtained from the peritoneal cavity of mice was successfully achieved by flow cytometry in this work, which allowed specific cytokine expression analyses in each macrophage subpopulation. Results obtained from these experiments showed that, even when the subpopulation of SPM increased after the inflammatory stimuli with EVs of the parasite (expressing high levels of pro-inflammatory cytokines like IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6), an increased expression of regulatory cytokines such as IL-10, IL-15 and TGF- $\beta$  by this subpopulation was also observed. A similar result was obtained when performing the expression analyses of cytokines

from the subpopulation of LPM, in which both regulatory (IL-10, IL-15, IL-38 and TGF- $\beta$ ) and proinflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17) cytokines were found to be increased. It should be highlighted that no expression of IL-2, IL-4, IL-9, IL-21, IL-23 and IL-25 was detected in SPM nor LPM subpopulations, even when the challenges were performed using trypomastigotes or LPS (positive controls). In this sense, our results confirm that SPM and LPM subpopulations could not be classified as M1 and M2, since both types of subpopulations are able to express pro-inflammatory and non-inflammatory cytokines as suggested elsewhere.

Differential expression levels of cytokines in mice stimulated with EVs or with the immune complexes EVs - IgGs anti *T. cruzi* were found, which could be related to the fact that IgGs present in these ICs interact with Fc $\gamma$  receptors. IgGs bind to specific Fc receptors present on the cell membranes of macrophages and allow the opsonization of antigens and phagocytosis of immune complexes. Based on these receptors present on the surface of the cells, the effector functions initiated by antibodies are triggered by the Fc domain upon binding to FcR receptors, functions that are largely dependent on the N-terminally bound biantennary glycan of immunoglobulin heavy chains, located below the immunoglobulin hinge region. This glycan is considered to hold the two Fc heavy chains in an open conformation necessary to interact with activating Fc $\gamma$  receptors (Fc $\gamma$ Rs). However, the presence in the sugar chain of terminal sialic acid in the glycan has profound implications on the effector functions of Fc by inhibiting activation by cells (Anthony &

Ravetch, 2010), as FcRγIIB receptors would be responsible for binding to such immunoglobulins carrying sialic acid in their Fc (Takai et al., 1996). In this sense, the presence of sialic acid, bound in an α2,6 bond to the penultimate terminal galactose of the glycan (Anthony et al., 2008) reduces FcγR binding and converts IgGs antibodies to anti-inflammatory mediators (Schwab et al., 2014), thus sialylated IgGs would be responsible for the anti-inflammatory activity of intravenous immunoglobulin (IVIg) therapy (Schwab et al., 2014). IVIg therapy is based on the anti-inflammatory activity of immunoglobulins derived from plasma of healthy donors and is commonly employed in inflammatory pathologies such as autoimmune diseases (Galeotti et al., 2017) due to its regulatory properties, as it induces a polarization of M2 into M1 macrophages (especially in tumor-related macrophages). For this therapy, immune complexes with sialylated Fcs initiate an anti-inflammatory cascade via the receptor or lectin SIGN-R1 or DC-SIGN (O'Neill et al., 2013), which works as a receptor of IgGs enriched in sialic acid (Anthony et al., 2008) in humans, and this would lead to a surface expression of the FcR inhibitor (FcγRIIB) on inflammatory cells, thereby attenuating inflammation as it happens with B cells, in which this receptor negatively regulates activating signals (Schwab & Nimmerjahn, 2013). It has also been suggested that the effects of IVIg would depend on the activation/polarization state of macrophages; the strongest association between treatments with high doses of IgGs and macrophage polarization seems to depend on Fc receptors of immunoglobulins, which play a major role in macrophage

regulation. For our study, it is important to highlight that B lymphocytes from C57BL/6 mice lack this receptor (Takai et al., 1996) and this could explain the differences in the proportion of LPM and SPM cell subpopulations obtained when mice were challenged with sialylated and non-sialylated ICs when compared to CD1 mice (Figure S12), in which SPM subpopulation did not increase after the challenges. In this sense, a possible role of this receptor in immune modulation and probably in monocyte migration and transformation into SPM in the peritoneal cavity of C57BL/6 mice is suggested.

Our results reveal an opposite behavior in the expression of IL-1 $\beta$  in both macrophage subpopulations; in this regard, while this cytokine expression was reduced after all the stimuli performed in SPM, in LPM the expression was increased after all of the stimuli employed, especially in ICs formed with sialylated IgGs. However, an increased expression of IFN- $\gamma$  was only observed in SPM after the challenge with ICs formed with non-sialylated IgGs. Regarding IL-12 and IFN- $\gamma$  expression in SPM, the levels obtained were under the expression levels of the negative control, except for the IFN- $\gamma$  expression after the stimulation with non-sialylated ICs which was increased; it is noteworthy that IL-12 induces the expression of IFN- $\gamma$  (Hamza et al., 2010). On the contrary, LPM stimulated with EVs showed increased levels of IFN- $\gamma$  when compared to the negative control or when mice were stimulated with sialylated ICs. In the case of IL-12, all the employed stimuli increased the cytokine expression, and for TNF- $\alpha$ , expression levels in all cases were higher than the control in this subpopulation.

IL-18, a cytokine that belongs to the IL-1 superfamily, is produced by macrophages and other cell types (L. Chen et al., 2013; Stoll et al., 1998) and has pleiotropic roles (Yasuda et al., 2019) including the regulation of IL-12 expression (Wawrocki et al., 2016) and, thus, IFN- $\gamma$  (Dinarello, 2001). In monocytes stimulated with IL-12 and IL-18, morphological changes in cells are observed, suggesting the role of these cytokines in differentiation and activation of monocytes into macrophages (Coma et al., 2006), increasing their phagocytic capacity (Xu et al., 2014). Under our experimental conditions, a diminished expression of this cytokine was observed in SPM of mice stimulated with EVs and sialylated ICs; however, in LPM, increased expression of this cytokine was observed under the same stimuli. The lower expression levels of IL-12 and the higher expression levels of IFN- $\gamma$  in SPM of mice stimulated with non-sialylated ICs could correspond to an induction of IL-12 by IL-18, with the consequent induction of IFN- $\gamma$  as a result of Fc $\gamma$ R stimulation by non-sialylated Fc regions of IgGs. Overall results of IL-18 expression suggest that the route of activation of the Th1 response is different in both types of cells and might depend on Fc receptors and on PAMP activation after the phagocytosis of non-sialylated ICs (Kaplanski, 2018).

As IL-18 and IL-12 trigger the production of IFN- $\gamma$  during an infection, Berclaz et al. evaluated the role of these cytokines in the regulation of FC $\gamma$ R expression in cell membranes by GM-CSF/PU.1, which is related to increased IFN- $\gamma$  expression in alveolar macrophages (Berclaz et al., 2002). In these cells, the expression of IL-18 was augmented by GM-CSF expression *in*

*vivo*, which contributes to the expression of FCyR in the macrophage surface as GM-CSF is able to regulate the constitute expression of this type of receptors and thus, opsonization and phagocytosis. The effect of GM-CSF over FCy receptors was also studied previously by Rossman et al. in 1993, revealing a significant increase only in the FCyRII receptor. These studies show how GM-CSF increases FCyRII expression in monocytes, favoring the clearance of the immune complexes; in this sense, a similar mechanism could be employed by LPM of the peritoneal cavity, especially when the stimulation is performed with EVs or sialylated ICs.

Regarding IL-6 expression, increased levels were observed in SPM of EVs-stimulated mice, followed by sialylated ICs; for non-sialylated ICs, undetectable levels were obtained. In the case of LPM of mice challenged with EVs and non-sialylated ICs, higher expression levels were obtained when compared to the control. The role of IL-6 in the immune response toward *T. cruzi* was studied by Sanmarco et al., who compared the expression of this cytokine in wild type mice vs. knockout mice and showed how IL-6 deficient mice produced higher amounts of NO in plasma, accompanied by increases in IL-1 $\beta$  and more inflammatory circulating monocytes (Sanmarco et al., 2017). In our study, nitric oxide synthase (NOS) expression levels in LPM of mice stimulated with non-sialylated ICs were higher than levels obtained in the other study groups in which IL-6 was not detected, while NOS expression levels in mice stimulated with EVs and sialylated ICs were almost null, while IL-6 expression was increased. IL-6 can potentially exert an non-inflammatory



response through inhibition of IL-1 and TNF- $\alpha$  synthesis by macrophages (Akdis et al., 2011; Dienz et al., 2009), which could be considered a mechanism of regulation of the inflammatory Th17 response at low TGF- $\beta$  concentrations. Results related to the decrease in the expression levels of cytokines associated to the Th1 response (IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-12 and TNF- $\alpha$ ) in SPM, as well as IL-6 expression when mice were stimulated with EVs or sialylated ICs, could be explained by this mechanism.

In this study, the highest expression levels of IL-15 were observed in LPM of mice stimulated with sialylated ICs and in SPM of mice stimulated with EVs of the parasite. This cytokine is a potent autocrine regulator of the production of proinflammatory cytokines by monocytes and macrophages, which, at high concentrations, favors the production of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6, while, at low concentrations, favors the production of IL-10 (Alleva et al., 1997). In LPM, the lowest expression of *IL-15* induced by EVs and non-sialylated ICs, and the highest expression of *IL-10* and *TGF- $\beta$*  could be explained by this mechanism. Moreover, the increased expression of *IL-15*, *TNF- $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  in LPM of mice stimulated with sialylated ICs was not found in SPM. IL-15, in combination with GM-CSF, can induce the differentiation of monocytes into immature dendritic cells (Anguille et al., 2009); this could induce the differentiation of monocytes into SPM. In our study, sialylated ICs recruited more SPM to the peritoneal cavity, while non-sialylated ICs recruited more LPM and larger numbers of dendritic cells were obtained after this stimulus.

IL-10 antagonizes the expression of MHCII, co-stimulatory molecules B7.1/B7.2 (CD80/CD86) and proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and, especially, IL-12 (Pestka et al., 2004; Saraiva & O'Garra, 2010). SPM is the subpopulation that expresses MHCII to a major extent and, after the challenge of mice with EVs and sialylated ICs, the expression levels of *IL-10* presented the highest increase, with decreased expression of *IL-1 $\beta$*  and *IL-12*. Moreover, when employing non-sialylated ICs for the challenge of mice, the expression levels of IL-10 as well as other non-inflammatory cytokines is null or under the expression levels of the negative control. In LPM, *IL-10* expression after the stimuli with both types of ICs was undetectable, a result that contrasts with the high expression of *IL-38* obtained for this type of subpopulation, also considered a regulatory cytokine. In SPM, instead, high levels of *IL-10* were observed after the challenge of mice with sialylated ICs; a fact that could be explained as a consequence of the interaction of sialylated groups in ICs with FcRgIIb and thus, the induction of this inhibitory cytokine.

The high expression levels of *IL-38* in LPM after the challenge of mice with sialylated ICs contrasts with the absence of expression of this cytokine in SPM. IL-38 is considered an important anti-inflammatory cytokine, which significantly inhibits IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL5, TNF- $\alpha$  and CXCL10 (related to the Th1 response), as well as IFN- $\gamma$  (Gresnigt et al., 2013). From our results, high expression levels of *IL-15* and *GM-CSF* in LPM of mice stimulated with sialylated ICs were observed; however, when the challenge was performed with non-sialylated ICs, this is the only

subpopulation in which *IL-17* expression levels were higher than in the control, possibly as a consequence of the stimulation through Fc $\gamma$ R receptors. The role of IL-17 in Chagas disease has previously been studied and the presence of low parasitemia has been related to the effect of this cytokine (Guedes et al., 2012). In this sense, in infected individuals with the indeterminate form of the disease or with mild cardiopathy, high levels of IL-17 and IL-10 were found, while high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were found in patients with severe cardiopathy. In this sense, it seems that IL-17 and IL-10 regulate the Th1 response in order to avoid cardiac involvement (Braga et al., 2022). LPM of mice challenged with non-sialylated ICs expressed *IL-17* but not *IL-10*.

The results obtained from this work suggest that the immunological tolerance exerted by *T. cruzi* EVs and ICs by macrophages inhibits the response and decreases the secretion of proinflammatory cytokines. Which allow macrophages to control inflammation, avoiding tissue damage caused by an excessive inflammatory response (Zubair et al., 2021) and could be related to the type of immune response that predominates in each phase of the disease (acute or chronic), and thus, to the pathology of chronic Chagas disease, as the Fc region of IgGs that form the ICs interact with Fc $\gamma$ R (specially Fc $\gamma$ RIIB), eliciting or inhibiting the immune response and favoring (or not) the presence of the parasite and clinic manifestations of the disease. However, the virulence and type of clinic manifestation presented will depend on the parasite strain, as well as the amount of IgGs and the isotypes that could be sialylated as it also happens in other inflammatory or autoimmune diseases.

## Supplementary Material

### Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* and immune complexes they form with sialyzed and non-sialyzed IgGs increase small peritoneal macrophage subpopulation and elicit different immunomodulatory responses

Alberto Cornet-Gomez<sup>1</sup> †, Lissette Retana Moreira<sup>1, 2, 3</sup> †, Mercedes Gomez Samblas<sup>1</sup>, Antonio Osuna<sup>1\*</sup>

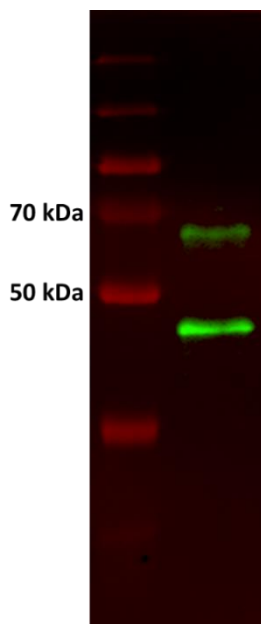
<sup>1</sup>Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular (CTS 183), Departamento de Parasitología, Campus de Fuentenueva, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

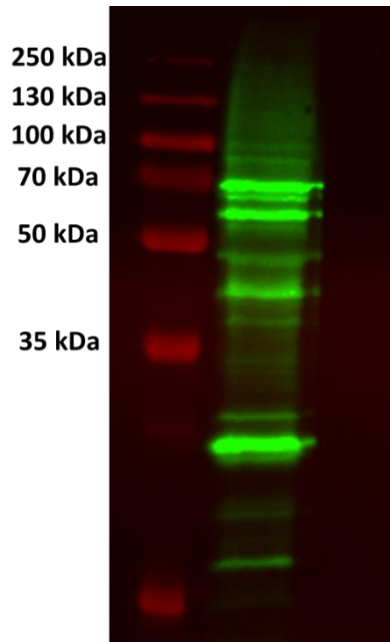
<sup>3</sup>Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

† These authors contributed equally to this work.\* **Correspondence:** Antonio Osuna; aosuna@ugr.es

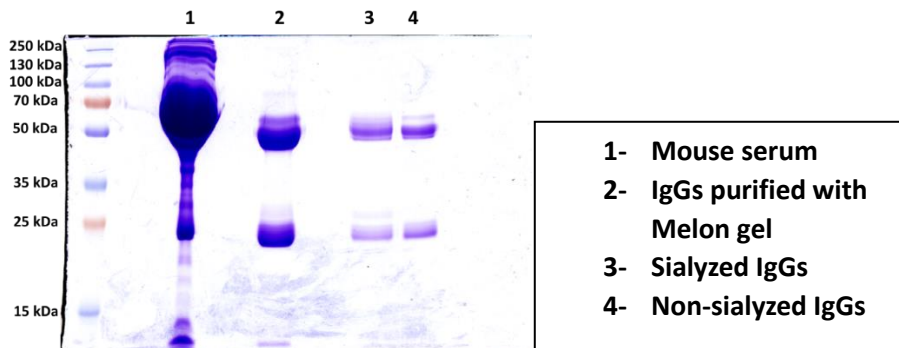
#### Supplementary Figures



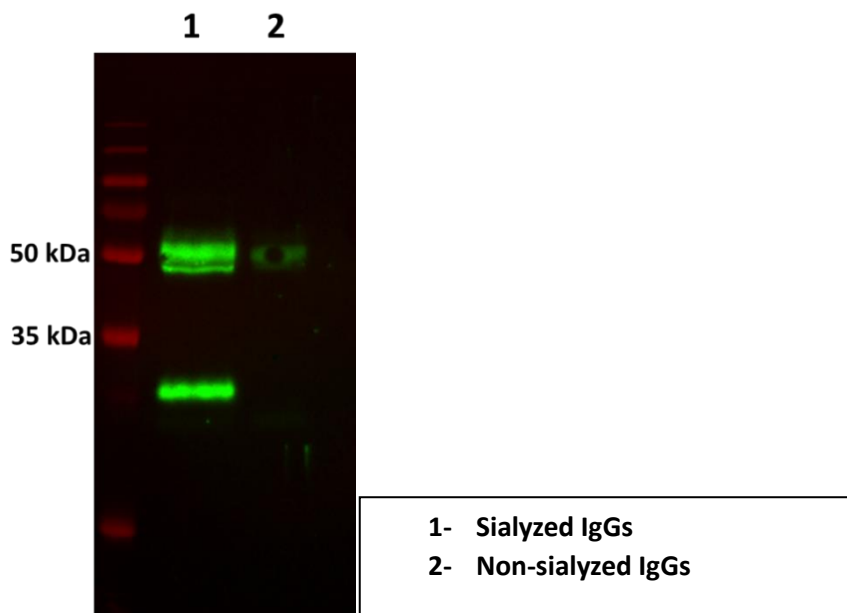
Supplementary Figure 1. Western blot analysis of cruzipain in extracellular vesicles in trypomastigotes of *T. cruzi*



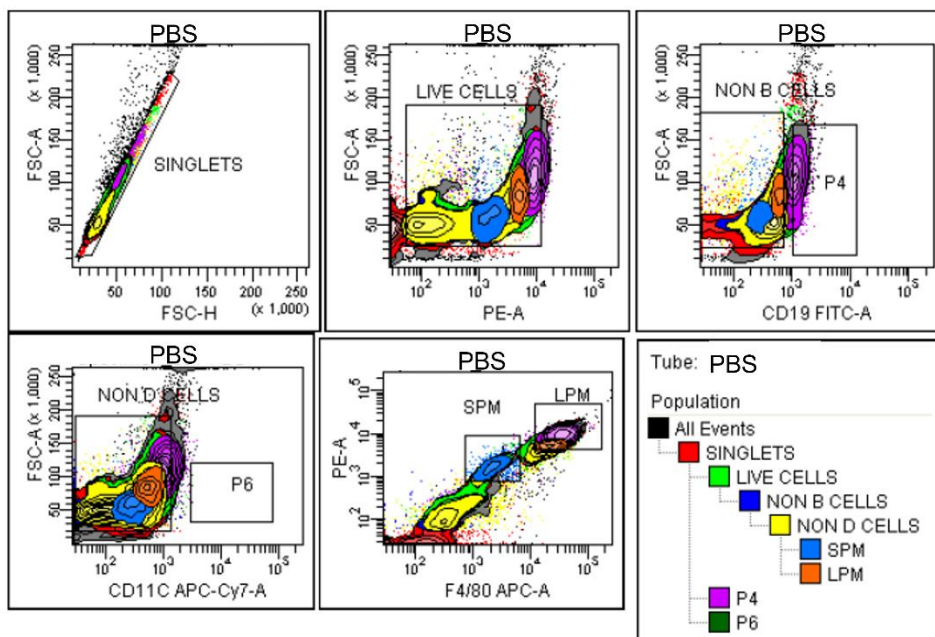
**Supplementary Figure 2. Western blot analysis of a lysate of trypomastigotes revealed with polyclonal anti-*T.cruzi* antibodies**



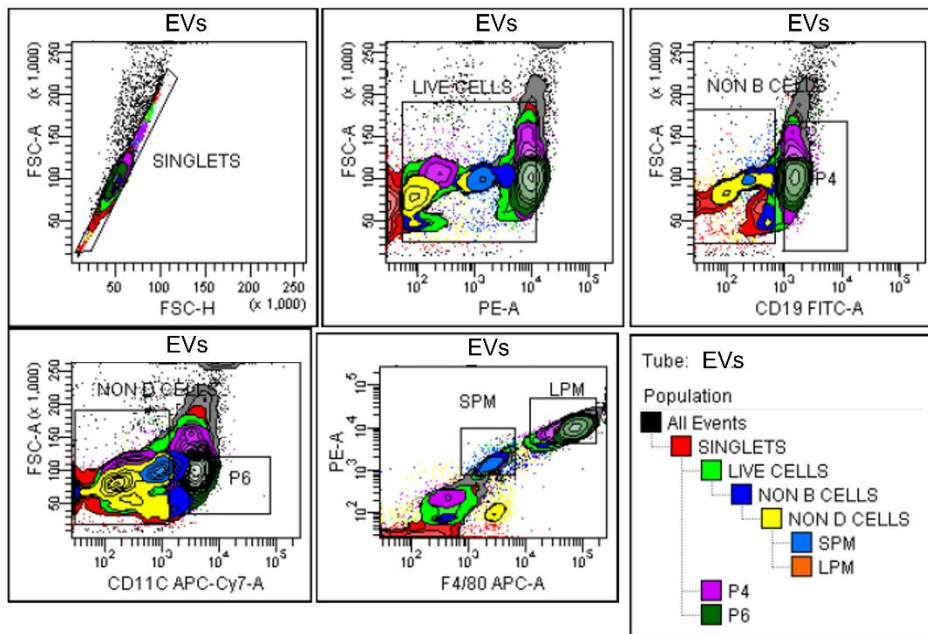
**Supplementary Figure 3. Immunoglobulin purification**



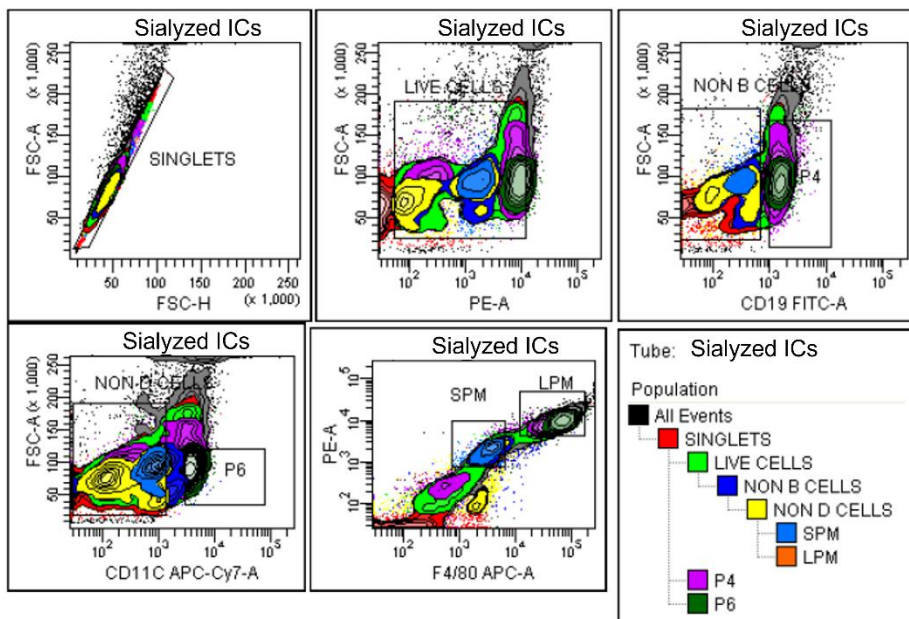
**Supplementary Figure 4.** Western blot analysis of purified IgGs revealed with *Sambucus Nigra* Lectin



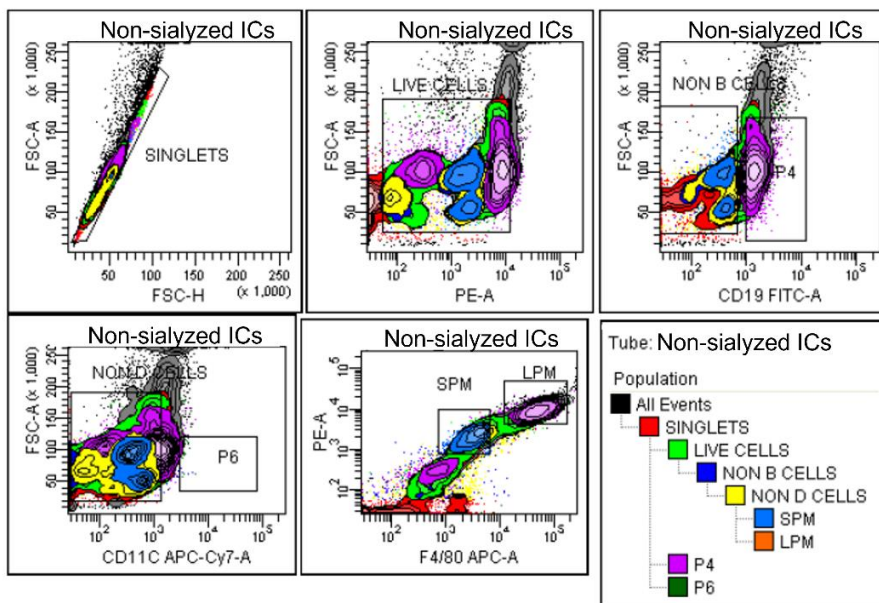
**Supplementary Figure 5.** Cytograms and gating strategy employed to separate LPM and SPM in PBS-injected mice.



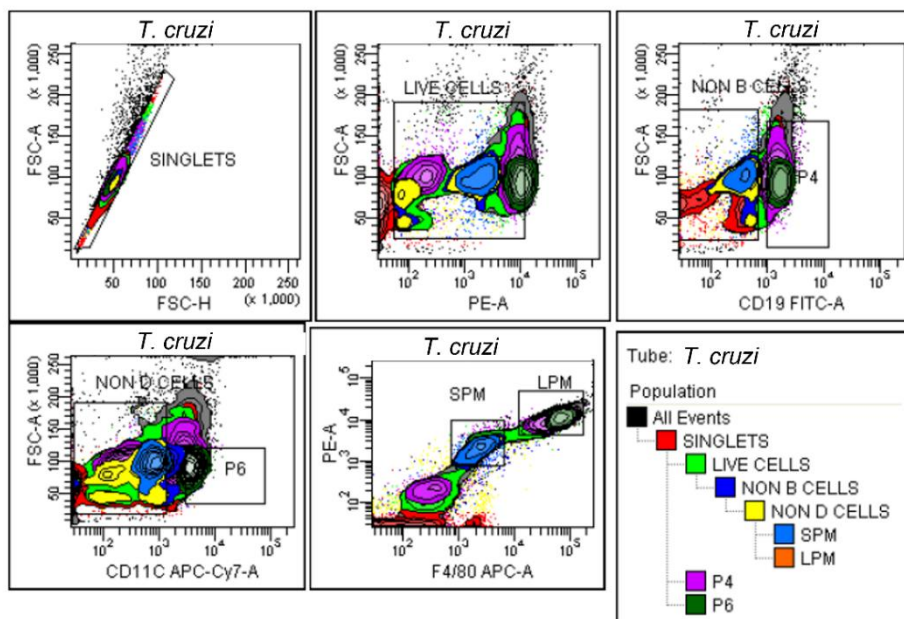
**Supplementary Figure 6.** Cytograms and gating strategy employed to separate LPM and SPM in EVs-injected mice.



**Supplementary Figure 7.** Cytograms and gating strategy employed to separate LPM and SPM in sialyzed ICs-injected mice.

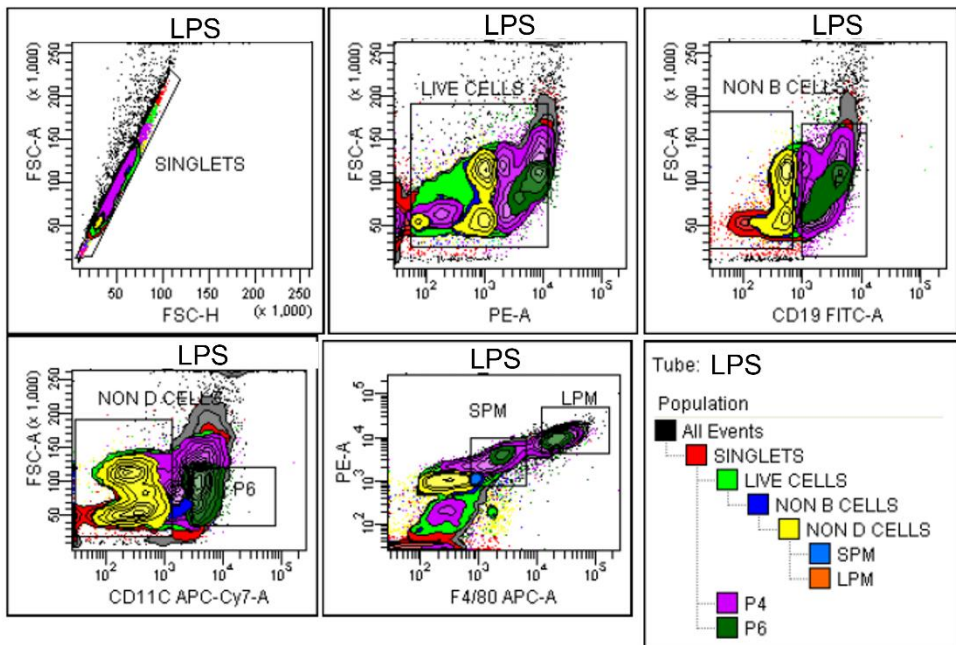


**Supplementary Figure 8.** Cytoplots and gating strategy employed to separate LPM and SPM in non-sialyzed ICs-injected mice.

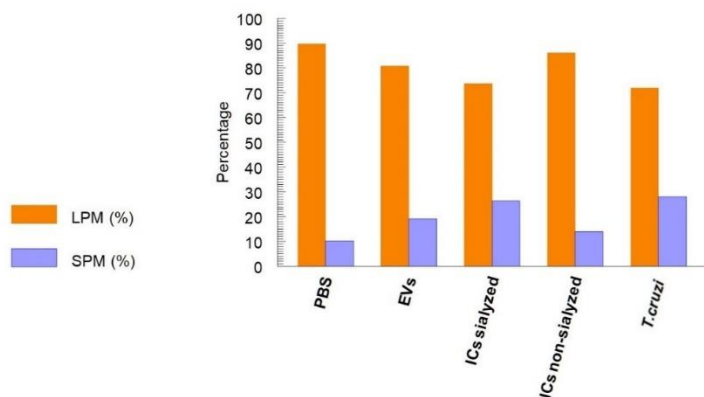


**Supplementary Figure 9.** Cytoplots and gating strategy employed to separate LPM and SPM in *T. cruzi*-injected mice.





**Supplementary Figure 10.** Cytopgrams and gating strategy employed to separate LPM and SPM in LPS-injected mice.



**Supplementary Figure 11.** Percentage of macrophage subpopulations (SPM and LPM) collected from peritoneal cavity of CD1 mice after different stimuli using flow cytometry.

## Supplementary tables

**Table S1.** Antibodies and dilutions employed for the analysis and separation of LPM and SPM, following the protocol previously published by Bou Ghosn et al. (2010)

Antidody	Dilution	Brand
anti-CD19-FITC	1:50	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
anti-CD11c-APC-Cy7 clone N418	1:50	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
anti-rat PE CD11b	1:20	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
F4/80-APC antibody	1:50	Miltenyi, Teterow, Germany
anti-mouse I-A/I-E (MHCII)-PerCP/Cyanine5.5	1:50	Biolegend, San Diego, CA, USA

**Table S2.** Sequences of the forward and reverse primers employed for gene amplification and expression analyses.

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
IL-1 $\beta$	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	CTCTTGTTGATGTGCTGCTG
IL-2	CCACTTCAAGCTCCACTTCA	ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT
IL-12	GACCAAACCAGCACATTGAA	CTACCAAGGCACAGGGTCAT
IL-18	GACCAAACCAGCACATTGAA	CTACCAAGGCACAGGGTCAT
TNF $\alpha$	CCCCAAAGGGATGAGAAGTT	CACTTGGTGGTTTGCTACGA
IFN $\gamma$	CACCCTGAAGTCGTTGTGAA	GATCTCCCCACTCCGGTTAT
G-CSF	TCCAGGGACTTAAGCAGGAA	CAGAGGCGGATGAAGCTAAT
IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCCAGAGAAC
IL-15	CATTTTGGGCTGTGTCAGTG	TGCAACTGGGATGAAAGTCA
TGF $\beta$	TGGAGCAACATGTGGAACTC	AGCCTTGTATCCCGTCTCTT
IL-10	CAGAGCCACATGCTCCTAGA	TCATTTCCGATAAGGCTTGG
IL-17	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA	TCATGTGGTGGTCCAGCTT
IL-38	TCAGTATGGGTGGAGGGT	ACAACGGGAGGTGAACAAA
GAPDH	ATGTGTCCGTCGTGGATC	ACCTGGTCCTCAGTGTAGC

**Table S3.** Results showing the total number of cells belonging to the different populations obtained after each stimulation.

	Events	Singlets	Live cells	B Cells	Non-B Cells	Dendritic Cells	Non-dendritic Cells	Macrophages	SPM	LPM
<b>PBS</b>	10000	5633	4924	156	4768	123	4645	3649	506	3143
<b>EV</b>	10000	8694	6394	581	5813	3175	2638	926	444	482
<b>ICs sialyzed</b>	10000	8299	5374	1915	3459	343	3116	1260	913	348
<b>ICs non-sialyzed</b>	10000	7973	5477	721	4756	1986	2770	2001	772	1229
<b><i>T.cruzi</i></b>	10000	8761	5123	368	4755	799	3956	1551	1028	523
<b>LPS</b>	10000	8695	7116	1320	5796	768	5028	2038	1888	150

# 7. Discusión



El secretoma celular se define como el conjunto de moléculas que una célula segrega al medio extracelular; la importancia biológica del secretoma comenzó a ponerse en valor tras los primeros estudios con los medios condicionados (Niu & Twitty, 1953). El término “medio condicionado” se refiere a la fase líquida de un cultivo celular, el cual se encuentra enriquecido con secreciones liberadas por las células o tejido cultivados el dicho medio (Rosochowicz et al., 2023).

Las vesículas extracelulares (EVs) constituyen la fracción particulada del secretoma celular, las cuales conforman gran parte de los productos secretados por las células (Rosochowicz et al., 2023; W. Zhang et al., 2018). Además, las EVs al confinar y proteger a las moléculas por la membrana de dichas vesículas, hace que posean un mayor tiempo de vida en el medio que las moléculas no particuladas, lo que sugiere que podrían desempeñar un papel más relevante en la comunicación intercelular (Fitts et al., 2019).

Las EVs de *T. cruzi* son unas de las vesículas secretadas por protozoos parásitos más estudiadas, junto con las de *Leishmania* y *Plasmodium*, y a pesar de que algunos aspectos de su funcionalidad, su efecto sobre la fisiología celular y la respuesta inmunitaria que generan ha sido estudiada por diferentes autores, el conocimiento a nivel molecular de su funcionalidad sigue siendo muy escaso, quizás por la complejidad que estos estudios implican. Además, *T. cruzi* es una especie que agrupa a diferentes variantes o cepas, clasificadas como diferentes Unidades Discretas de Tipificación

(UDTs) que pretenden explicar los diferentes comportamientos del parásito, desde su infectividad a diferentes células, diferencias en cuanto a la patología por lo que, en ocasiones, es complicado extrapolar los resultados obtenidos tras el análisis de una cepa con otros análisis realizados en otras UDTs o incluso cepas de la misma UDT.

En la presente tesis doctoral se ha pretendido contribuir al conocimiento de la funcionalidad de las EVs liberadas por las formas infectivas de la cepa de *T. cruzi* Pan4, cepa correspondiente al UDT TcI (Cura et al., 2010), con la que se ha llevado a cabo la mayoría de los trabajos con EVs en nuestro grupo de investigación, y en los que se ha evitado en todo momento utilizar las EVs procedentes de las formas no infectantes (epimastigotas), a pesar de la complejidad metodológica que comporta, exceptuando aquellos estudios (**capítulo 1**) donde se usaron comparativamente para explicar las diferencias existentes entre las EVs de los dos estadios.

El **capítulo 1** contribuyó a la caracterización proteómica y el estudio de algunas propiedades físicas de las EVs liberadas por los tripomastigotes infectivos frente a segregados por los epimastigotes no infectivos, con objeto de tratar de dilucidar las características de ambas EVs y encontrar las diferencias que pudieran ser significativas en la interacción parásito-célula hospedadora. Algunas de las proteínas identificadas en las EVs liberadas por los tripomastigotes pueden jugar un papel importante como factores de virulencia, relacionadas con la adhesión e infección en la célula. Entre ellas las transialidasas,

las proteínas reguladoras del complemento, metaloproteasas, como GP63, presente en numerosas especies de tripanosomátidos, o las cistein peptidasas como la cruzipaína, todas ellas han sido consideradas como factores de virulencia y participan en la infectividad del protozoo.

Las transialidasas (TcTS) son una superfamilia de proteínas consideradas como un importante factor de virulencia, debido a su capacidad para mediar en la interacción parásito-célula y por su capacidad inmunomoduladora (Freire-De-Lima et al., 2015). Las TcTS son una de las proteínas constitutivas predominantes en el secretoma de *T. cruzi*, estas proteínas están ancladas a la membrana de las EVs mediante GPIs (Brossas et al., 2017).

*T. cruzi* carece de la capacidad de sintetizar ácido siálico *de novo*, por lo necesita captar ácido siálico para ligarlo a la parte glicosilada de las cadenas de glúcidos que constituyen el *core* azucarado de las glicoproteínas. *T. cruzi* capta el ácido siálico desde las células con las que interacciona mediante la acción de las TcTS enzimáticamente activas, que lo transfieren desde las glicoproteínas del hospedador a las proteínas del parásito, especialmente a las mucinas de la superficie de las formas infectantes (Previato et al., 1985). De esta manera, el papel de las TcTS es relevante dado que las glicointeracciones en las que interviene el ácido siálico son esenciales para la infectividad, la evasión de los mecanismos de la respuesta inmunitaria y la patogénesis de *T. cruzi* (Campetella et al., 2020; de Lederkremer et al., 2022; Fonseca et al., 2019; Lantos et al., 2016).



## Discusión

La relación entre la presencia de residuos de ácido siálico en la superficie celular y la adhesión e infección parasitaria ha sido ampliamente descrita (Previato et al., 1985). Uno de los mecanismos propuestos consiste en que las TcTS favorecen la adhesión mediante la catálisis de la sialización de glicoproteínas presentes en la membrana del parásito como son las mucinas, estas enzimas captan residuos de ácido siálico de proteínas celulares y los transfieren a sus proteínas de membrana, favoreciendo la adhesión del parásito a las células (Jacobs et al., 2010). De hecho, la tasa de infección celular se reduce de una manera dosis-dependiente al agregar un inhibidor de la reacción catalizada por las TcTS (Carvalho et al., 2010).

Como hemos descrito en el **capítulo 1**, existen TcTS enzimáticamente activas (aTcTS) y otras inactivas (iTcTS), aunque ambos tipos de TcTS comparten la misma especificidad de sustrato para los glucotopos que contienen  $\alpha$ -2,3-SA. En la actualidad se sabe que las iTcTS favorecen la infectividad de los parásitos, ya que las iTcTS muestran propiedades de lectina, probablemente debido a la presencia del motivo conservado conocido como dominio FLY (VTVxNVxLYNR), el cual tiene la capacidad de unirse a la célula huésped; este dominio FLY, está presente en 371 miembros de la superfamilia TcTS (Todeschini et al., 2004; Tonelli et al., 2010).

Además, algunas TcTS son capaces de unirse a receptores Trk (receptores tirosin-kinasa, relacionados con señalización y la tropomiosina) en células de mamíferos a través del dominio de 21 aminoácidos llamado PPDF (Chuenkova & PereiraPerrin,

2005). En 2006, se describió que parásitos que sobreexpresan TcTS en la superficie escapaban antes de la vacuola endocítica que los parásitos que no la sobreexpresaban, lo que indica que estas enzimas intervienen en la salida del parásito internalizado en la vacuola parasitófora (Rubin-de-Celis et al., 2006). Todos estos estudios demuestran que los miembros de la superfamilia de TcTS son capaces de favorecer la virulencia parasitaria mediante diferentes mecanismos, los cuales aún no están plenamente dilucidados (De Pablos & Osuna, 2012; L. M. Freitas et al., 2011). Siguiendo la clasificación propuesta por Freitas y colaboradores en 2011, agrupamos las TcTS en grupos Ts I-VIII (L. M. Freitas et al., 2011). Las EVs de tripomastigotes mostraron una alta carga de TcTS ( $n = 121$ ), encontrando proteínas pertenecientes a todos los grupos en los que se clasifican las TcTS (I-VIII), mientras que en las EVs liberadas por epimastigotes, las formas no infectivas, y que se desarrollan en el intestino de insecto, las TcTS fueron menos abundantes limitándose a TcTS pertenecientes al grupo II ( $n = 33$ ).

Entre las TcTS descritas, destacamos las pertenecientes al grupo II de TcTS, el cual engloba proteínas relacionadas con la adhesión y la infección en la etapa tripomastigote, como SA-1, SA85, gp90, gp82 y ASP-2.

Además, las EVs de tripomastigotes también mostraron Tc13 (TS grupo IV), que se expresa altamente en tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos, siendo esta proteína capaz de unirse a los receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos y modificar la actividad contráctil del miocardio. En este sentido, las EVs

liberadas por tripomastigotes han mostrado capacidad de interactuar con este receptor, hecho que puede estar mediado por la exposición de la proteína Tc13 en la superficie de las vesículas (García et al., 2003; Joensen et al., 2003).

Otro grupo de proteínas TcTS descritas en el proteoma de las EVs de tripomastigotes con actividad conocida, son las proteínas reguladoras del complemento (CRP) las cuales juegan un importante papel en el escape del sistema inmunitario restringiendo la activación clásica y la alternativa de la cascada del complemento y por lo tanto la lisis del parásito (De Pablos & Osuna, 2012). Las CRP juegan un papel importante en la patogenia de la enfermedad de Chagas, ya que se unen al C3b y C4b, disminuyendo la activación de la C3 y C5 convertasas (Beucher & Norris, 2008).

De hecho, la inmunización de ratones con un constructo de ADN del gen *crp*, confirió resistencia frente a la infección posterior con *T. cruzi* (Sepulveda et al., 2000), por lo que la presencia de estas proteínas en las EVs descrita en el **capítulo 1**, implica que las EVs podrían jugar un papel en el escape del sistema inmunitario ejercido por *T. cruzi*, el cual se analizó en el **capítulo 3**.

Por su parte, GP63 es una metaloproteasa dependiente de zinc, conservada en tripanosomátidos como *Leishmania* y *Trypanosoma brucei*, donde es bien conocida como un importante factor de virulencia, favoreciendo la adhesión de promastigotes y protegiendo de la degradación intrafagolisosomal (Chang & Chang, 1986; McGwire & Chang, 1994). Pese a que esta proteína ha sido menos estudiada en *T.*

*cruzi* que en otros tripanosomátidos, también existen trabajos que han demostrado que la inactivación de esta enzima con anticuerpos neutralizantes, provoca una disminución en la tasa de infección celular (Cuevas et al., 2003; Kulkarni et al., 2009).

La cruzipaína es una de las cistein proteasa (CP) mejor conocidas de *T. cruzi*, cuya presencia en las EVs liberadas por tripomastigotes ha sido descrita en el **capítulo 1**. Estas enzimas se consideran como importantes factores de virulencia en la enfermedad de Chagas, ya que favorecen la invasión celular mediante una vía de infección dependiente del procesamiento del quininógeno celular por parte de estas proteasas (Alvarez et al., 2012; Aparicio et al., 2004; Del Nery et al., 1997).

De los estudios aportados en el **capítulo 1** se deduce que, a diferencia de las TcTs, que se encuentran ancladas en la superficie de la membrana de las EVs, la cruzipaína posee dominios externos en la membrana de la EVs y dominios en el interior de la EVs no digeribles tras un tratamiento con proteinasa K. Se ha especulado con el potencial uso de las cistein proteasas como diana terapéutica en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, como es el compuesto denominado K777, un inhibidor de estas enzimas que presentó buenos resultados en ensayos preliminares, aunque desencadenó efectos tóxicos para su uso terapéutico, ya que la inhibición de estas proteasas y como consecuencia de la falta de especificidad del compuesto, actúa también sobre las enzimas del hospedador desencadenando efectos tóxicos (Avelar et al., 2015; Burtoloso et al., 2017).

Además de las diferencias a nivel proteico, en el **capítulo 1**, se analizaron las diferencias en las propiedades nanomecánicas que mostraban las EVs de ambas formas del parásito. Las EVs liberadas por tripomastigotes mostraron una mayor capacidad de adhesión que las EVs de los epimastigotes y valores de rigidez y elasticidad menores; asimismo, las EVs liberadas por tripomastigotes mostraron un potencial zeta menos electronegativo que el de los epimastigotes. Estos resultados sugieren que las diferencias biofísicas diferenciales de las EVs pueden estar relacionadas con el glicocálix que portan y la carga externa de proteínas que poseen las EVs de los tripomastigotes.

La participación de las proteínas de superficie en las propiedades nanomecánicas se puso de manifiesto también en el **capítulo 1**, tras el tratamiento de las EVs con proteinasa K (PK). Tratamiento que no afecta a las proteínas que portan en su interior, limitando su actividad a la digestión de las proteínas de superficie de las EVs. El tratamiento con PK produjo un aumento drástico de la rigidez y elasticidad en las EVs nativas de tripomastigotes alcanzando los valores máximos, mientras que las EVs nativas mostraban la mínima rigidez y elasticidad inferior incluso a las EVs de las formas no infectivas, lo que hace atribuible dichos parámetros a la carga de proteínas externas que portan las distintas EVs. Muchas de las proteínas de superficie aparecen como glicoproteínas que participan en las interacciones con lectinas celulares y receptores de la membrana de la célula huésped con residuos de carbohidratos, incluido el ácido siálico.

En base a la mayor electronegatividad de las EVs de los tripomastigotes resultante tras la interacción con fetuina (una proteína altamente sializada) las TcTS transportadas en las EVs de los tripomastigotes, serían capaces de transferir moléculas de ácido siálico desde las proteínas sializadas a las glicoproteínas de superficie de las EVs, aumentando la electronegatividad final de las EVs, similar a lo que ocurre durante la interacción con la membrana celular. En publicaciones previas, se ha descrito la disminución del potencial zeta de EVs liberadas por células tumorales respecto a las células sanas, debido a un aumento de la presencia de moléculas de ácido siálico en las mismas (Akagi & Ichiki, 2016; Mendivil-Alvarado et al., 2023; Whitehead et al., 2015). De hecho, Mendivil-Alvarado y colaboradores proponen las modificaciones del potencial zeta de las EVs como un factor de prognosis de pacientes con patologías tumorales (Mendivil-Alvarado et al., 2023).

La presencia de factores que contribuyen a la capacidad de unión de las EVs a las células y las diferencias que muestran las EVs procedentes de las formas infectivas de las EVs de las formas no infectivas en la adhesión, elasticidad y carga eléctrica, descritas en el **capítulo 1**, nos condujo a evaluar las modificaciones que dichas EVs generan en la célula hospedadora. Nuestro grupo ya había estudiado previamente algunos de los cambios que se generan a nivel de fisiología celular, en las células tras la interacción de las EVs de las formas tripomastigotes. Algunos de dichos cambios consisten en una interrupción del ciclo celular en fase G0/G1; la

## Discusión

permeabilización de la membrana celular a macromoléculas, incluidas inmunoglobulinas IgGs capaces de reconocer la parte citosólica de los receptores  $\beta$  adrenérgicos, involucrados en la patología cardíaca de la enfermedad de Chagas; la despolimerización de los filamentos de actina donde dicha proteína pasa de la forma F (actina polimérica fibrosa) a G-actina, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico; así como alteraciones en las rutas de señalización que, entre otros, conlleva a un aumento de las tasas de infección de las células al interactuar con las EVs de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* (Retana Moreira et al., 2019). Estos efectos observados constituyen efectos específicos para las EVs de *T. cruzi*, dado que la interacción con EVs procedentes de otros sistemas biológicos no generan los efectos mostrados cuando la interacción con la EVs de las formas infectantes del parásito (Retana Moreira et al., 2019).

El aumento de parasitación de *T. cruzi* en las células que han interactuado con las EVs de las formas tripomastigotes, no produce el aumento de infección de otros protozoos intracelulares (*Toxoplasma gondii*), siendo además específico para las EVs de *T. cruzi* dado que la interacción con EVs de otros sistemas celulares (células 3T3 o *Crithidia*) no produce el incremento de las tasas de parasitación de las formas infectantes del *T. cruzi* (Retana Moreira et al., 2019).

El objetivo en el estudio realizado y presentado en el **capítulo 2** fue estudiar los cambios a nivel transcriptómico de células no infectadas que interactuaron con EVs de *T. cruzi*, con objeto

de analizar las alteraciones de la transcripción medido en función de la expresión de RNAs como respuesta celular a dichas EVs.

En el año 2014, García Silva y colaboradores publicaron el análisis transcriptómico en células Hela que interactúan con EVs liberadas por formas epimastigotes (no infectantes) de la cepa DM28c de *T. cruzi* (García-Silva, Cabrera-Cabrera, et al., 2014). Dichos autores describieron alteraciones en la expresión en función del tiempo y que las rutas más afectadas fueron las de las Rho GTPasas, donde la RhoV GTPasa se activa a las 6 horas post-interacción, mientras que los genes *IL-6*, *IL-1R*, *IL-18* y la *CCL2* están regulados a la baja en las primeras horas de la interacción. Quizás esta estimulación posterior, sea como consecuencia de una activación de algunos de los TLRs, al portar las EVs de los epimastigotes tanto en su interior como en superficie, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas glicosiladas, todos ellos inductores de diferentes TLRs que desencadenan una activación de la respuesta inflamatorias, y como consecuencia de la misma se produzca una respuesta compensatoria. Los autores anteriormente mencionados no mencionan en su trabajo la posible activación de respuestas de IFN $\gamma$  ni de las interleuquinas relacionadas con la Th17, fundamentales en el desarrollo de la Enfermedad de Chagas.

Por otra parte, y como se ha indicado anteriormente, los epimastigotes constituyen la fase replicativa en el intestino del insecto vector careciendo de capacidad de invasión en las células de mamífero. Los epimastigotes, por tanto, deben



carecer de los mecanismos involucrados en la internalización del parásito en la célula. Cabe también destacar que las EVs liberadas por las formas epimastigotes poseen características físicas y bioquímicas diferentes a las que poseen las EVs de las formas tripomastigotes infectantes, como se muestra en el **capítulo 1** de nuestro trabajo. Por lo que, las modificaciones del transcriptoma ejercidas por EVs liberadas por los epimastigotes deben ser diferentes a las modificaciones transcriptómicas provocadas por la incubación con EVs liberadas por formas tripomastigotes. Por todo ello decidimos realizar el análisis transcriptómico de células Vero tras la interacción con EVs liberadas por las formas infectantes tripomastigotes de la cepa Pan4 de *T. cruzi*.

Como se explicó en el **capítulo 2**, el análisis transcriptómico de la interacción EVs de las formas infectantes en las células Vero mostró que hay 322 genes expresados diferencialmente en las células tras la interacción con las EVs respecto a las células control.

Los resultados obtenidos por el análisis de la expresión de los ARNm de las células confirman los resultados previos descritos por nuestro grupo (Retana Moreira et al., 2019). La interacción de las células Vero con las EVs, provoca una disminución de la expresión de los genes *RhoA*, *Rac1* y *CDC42*, que codifican proteínas que participan en la organización del citoesqueleto de actina (Retana Moreira et al., 2019). Las proteínas Rac1 y CDC42 están involucradas en mecanismos de señalización, y remodelación del citoesqueleto y en la generación de cuerpos

apoptóticos y ectosomas; la gemación de la membrana plasmática regulada por kinasas (PAK2, LIMK1, ROCK1, etc.) que activan a su vez a las Rac1 y CDC42, inducen la remodelación del citoesqueleto, posteriormente la Pannexin 1 y la Plexin B2 serán las mediadoras de la formación de los ectosomas (Santavanond et al., 2021; van der Pol et al., 2012).

Libisch y colaboradores realizaron una revisión en la que comparaban los resultados publicados hasta el momento de las variaciones del transcriptoma del hospedador tras la invasión por *T. cruzi* (Libisch et al., 2021). En dicha revisión se describe la gran variabilidad de los resultados publicados, dependientes de la cepa de *T. cruzi* utilizada, del hospedador (línea celular, ratón, rata o humanos), del tiempo del análisis y de la metodología utilizada. A pesar de la variabilidad, se observan resultados concordantes en la mayor parte de los trabajos, como son la activación de la ruta de PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3 kinasa), la cual consiste en una vía de transducción de señalización intracelular que promueve numerosos procesos celulares, como son la proliferación, el metabolismo, la supervivencia celular, el crecimiento y la angiogénesis en respuesta a señales extracelulares.

En nuestros análisis no se identificó el aumento de los principales componentes de esta ruta (RTKs, PI3K, PIP2, PIP3 y B/AKT), pero como se indica en el análisis de los términos de ontología génica, sí se observa la sobreexpresión de otras rutas que conllevan a procesos celulares similares, como son el metabolismo (lipídico y proteico) y la supervivencia celular, pero

también se observa un aumento de la desfosforilación, probablemente debido a la importante regulación a la baja de las MAPK (MAP kinasas) descritas en el **capítulo 2**.

El aumento de la supervivencia celular favorecida por la vía PI3K/ AKT previamente descrita, podría deberse a una inhibición de la apoptosis favorecida por las EVs.

En el **capítulo 2** se analizó la influencia de la interacción celular con las EVs de las formas infectivas en la inducción de la apoptosis. Se analizaron las modificaciones transcripcionales de los genes relacionados con la apoptosis, comprobándose como en las células Vero en presencia de las EVs de *T. cruzi* se induce la sobreexpresión del RNA no codificante ARNlnc HOXA-AS2 y del gen *csnk1g1*, considerados genes reguladores e inhibidores de los procesos apoptóticos; Zhao y colaboradores describieron como el silenciamiento de HOXA-AS2 en una línea celular de promielocitos (NB4) produjo un aumento significativo de la apoptosis (H. Zhao et al., 2013); por su parte CSNK1G1, inhibe la activación de la vía extrínseca de la apoptosis así como de la muerte celular dependiente de TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) una proteína que desempeña un papel importante en la regulación de la apoptosis. Cuando TRAIL se une a sus receptores en la superficie celular, desencadena una cascada de eventos intracelulares que lleva a la activación de proteínas pro-apoptóticas y, finalmente, a la muerte celular programada, inhibiendo la apoptosis mediada por Fas en células Hela. Además, la sobreexpresión de CSNK1G1 indujo un aumento de

fosforilación de BID, que reduce la activación de la ruta de las caspasas (Desagher et al., 2001; Schitteck & Sinnberg, 2014). Por último, el efecto anti-apoptótico propuesto por la sobreexpresión de estos reguladores de la apoptosis se comprobó mediante citometría de flujo utilizando anexina V-FITC como marcador de células apoptóticas. La inhibición de la apoptosis ejercida por las EVs de las formas infectantes podría constituir un mecanismo desarrollado por el parásito para favorecer la división de los amastigotes de *T. cruzi* en el citoplasma celular. La discordancia con los estudios previos de Mucci 2002 y 2005, podría deberse al diferente tipo de células en las que se llevaron los experimentos. El efecto pro-apoptótico se describió utilizando células del sistema inmunitario, mientras que las células Vero es un linaje aislado a partir de las células epiteliales del riñón de mono africano. Las EVs podrían ejercer mecanismos diferentes dependiendo de la naturaleza de la célula con la que interactúan (Mucci et al., 2002, 2005).

La SUMOilación constituye un mecanismo de modificación postraducciona l mediante el cual algunas de las proteínas celulares son covalentemente modificadas. Estas modificaciones se realizan fundamentalmente a través de las lisinas, mediante la adición de otra pequeña proteína globular, de masa molecular 11 kDa, llamada SUMO (*small ubiquitin-related modifier*). Dicha unión covalente es reversible e induce cambios conformacionales que pueden modificar las propiedades intrínsecas de las proteínas e incluso de su localización celular. SUMO participa en un gran número de funciones biológicas entre las que se incluyen, represión de la transcripción, ciclo

celular, apoptosis, localización intracelular e intranuclear y estabilidad de las proteínas, jugando diferentes papeles en aquellas células infectadas por diferentes virus, a fin de favorecer la multiplicación celular (Z.-J. Han et al., 2018).

En el **capítulo 2** se describe la sobreexpresión de las proteínas SUMO1, SUMO2 y UBE2C, participantes en los procesos de SUMOilación celular, y de la ubiquitinización por la sobreexpresión de la proteína UBE2C ejercida tras la interacción de las células con las EVs de los tripomastigotes de *T. cruzi*. Si bien no se conoce el papel de la SUMOilación o de la ubiquitinización en la parasitación por *T. cruzi*, nuestros resultados podrían estar en concordancia con los resultados obtenidos en los macrófagos parasitados por *Leishmania* donde se observa un aumento de la SUMOilación, en los macrófagos infectados con promastigotes metacíclicos infectivos de *Leishmania donovani*, y una disminución de este mecanismo celular cuando los macrófagos interaccionaron con formas promastigotas no infectivas de *L. donovani*, pudiendo relacionarse la sobreexpresión de los efectores de esta cascada de señalización con la inmunomodulación requerida para la supervivencia del parásito en el interior de los macrófagos (Singhal et al., 2022).

En el **capítulo 1** se describe la presencia de factores de virulencia inmunomoduladores en las EVs liberadas por formas tripomastigotes (TcTS, CRP, GP63, CP, etc.), junto con el análisis de las diferentes modificaciones en la transcripción a nivel celular, como son la inhibición de la apoptosis, la

disminución de la expresión de las Rho-GTPasas y la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la SUMOilación, previamente descritas en el **capítulo 2**, nos indujeron a estudiar, en el **capítulo 3**, la respuesta inmunitaria desencadenada en los macrófagos, células centinelas del sistema inmunológico, tras interactuar con las EVs secretadas por las formas infectantes del parásito, así como con los inmunocomplejos que forman dichas EVs, analizando la modulación de la respuesta ejercida por el ácido siálico terminal del glicano de las IgGs que forman dichos inmunocomplejos.

La conocida incapacidad de *T. cruzi* para la síntesis *de novo* de ácido siálico, como se ha apuntado anteriormente, se supera mediante la actividad de enzimas transialidasas activas y su capacidad para modular el sialoglicofenotipo de los glicanos tanto del parásito como de la célula hospedadora, escindiendo residuos terminales de siálico de los glicoconjugados de la célula huésped transfiriéndolos a los residuos terminales de galactosa  $\beta$ -ligados de las mucinas de la superficie del parásito; pero estas enzimas también podrían potencialmente modificar la sialización de las IgG circulantes.

El papel del ácido siálico en la inmunomodulación durante la infección por *T. cruzi* está controlado por los miembros activos de la TcTS, los cuales se consideran como factores de virulencia en las células de mamíferos (Freire-De-Lima et al., 2015), mientras que las TcTS inactivas desempeñan un papel modulando eventos relacionados con la adhesión e invasión del parásito en las células del hospedador actuando como lectinas.

## Discusión

Dado que los glucótopos que contienen ácido siálico en las IgGs, modulan al sistema inmunitario del hospedador, los cambios mediados por TcTS en la sialización de las moléculas similares a la mucina del parásito y los glucoconjugados de la célula hospedadora, alterarían algunos mecanismos fisiológicos críticos, incluida la activación de una respuesta inmunitaria disminuyendo el reconocimiento antigénico por parte de los anticuerpos, así como inhibiendo la activación del complemento (Argibay, 2002; Gao et al., 2002).

Aparte de las alteraciones inducidas por las TcTS a nivel celular, discutidas previamente, se han documentado en numerosos estudios la capacidad que muestran las TcTS para modular la funcionalidad de las células del sistema inmunitario del hospedador mamífero, como son los linfocitos T, y B induciendo apoptosis (Amon et al., 2014; G.-Y. Chen et al., 2014; Freire-De-Lima et al., 2015).

Así, la modulación de la actividad ejercida por la sialización en los linfocitos T, fue demostrada por Freire-De-Lima y colaboradores, que describieron como la presencia de residuos de ácido siálico en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> varía durante la maduración de los mismos, durante el desarrollo de una infección. Además, la alteración de la sialización de linfocitos regula la respuesta que desencadenan (Freire-De-Lima et al., 2015).

En 2010, Freire-De-Lima y colaboradores demostraron que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones infectados por *Plasmodium vivax*, muestran una alta presencia de ácido siálico. Sin embargo, en

ratones infectados con *T. cruzi*, los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, mostraban una menor cantidad de ácido siálico en los infectados por *P. vivax*. Además, la presencia de residuos de ácido siálico en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> fue aún menor cuando además de la infección por *T. cruzi* los ratones fueron inoculados con TcTS libre. Los animales que presentaban una menor sialización en estas células, mostraron una respuesta citotóxica insuficiente, sufriendo una mayor parasitemia que el grupo control (Freire-de-Lima et al., 2010).

Por otra parte, como se explicó previamente, se ha descrito que las TcTS tienen efectos proapoptóticos tanto en timocitos, como en linfocitos T maduros, que estos procesos de muerte celular son inducidos mediante la sialización de proteínas presentes en la membrana celular (Mucci et al., 2002, 2006).

Respecto al papel inmunomodulador ejercido por las TcTS sobre los linfocitos B, la inoculación del dominio catalítico de la TcTS indujo la activación de las células B de manera T-independiente, estimulando a su vez la síntesis de IL-6 (en medula ósea y esplenocitos) y de IFN- $\gamma$  (en esplenocitos) (Gao & Pereira, 2002). De igual manera, Bermejo y colaboradores demostraron la inducción de la síntesis de IL-17 por parte de los esplenocitos estimulados, la cual era dependiente de la sialización del receptor CD45 (Bermejo et al., 2013). La relevancia inmunogénica de esta superfamilia de proteínas del parásito ha respaldado el uso de la TcTS recombinante en numerosos estudios como antígeno vacunal con resultados prometedores

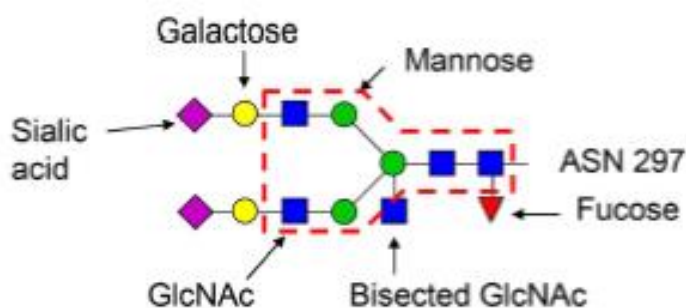


## Discusión

para su uso en vacunación (Castro et al., 2023; Pacini et al., 2023).

Las inmunoglobulinas G son glicoproteínas capaces de unirse a los antígenos y neutralizarlos, promoviendo tanto la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, como la opsonización de los antígenos para favorecer la fagocitosis o la acción del complemento.

Mientras que la especificidad antigénica de los anticuerpos está determinada por la región Fab (hipervariable), la cual es responsable de la unión a los epítopos de los antígenos, las funciones efectoras iniciadas por los anticuerpos son desencadenadas por el dominio Fc (región cristalizante). Las funciones efectoras de las IgG dependen en gran medida de la composición del glicano biantenarico el cual se encuentra unido a la asparagina 297 (Asn297) de ambas cadenas pesadas de la región Fc de la IgG, que reside justo debajo de la región bisagra (Figura 16). Además, la fracción glucídica de las IgG mantiene las cadenas pesadas del Fc en una posición abierta necesaria para las interacciones con los receptores Fcγ (FcγR) (Anthony & Ravetch, 2010).



**Figura 16.** Estructura de la fracción glucídica unida a la Asparragina 297 de las IgG humanas. Las variaciones del patrón de glicosilación residen en la presencia de fucosa, N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico.

Las IgGs, aparte de bloquear los epítomos de los antígenos y de favorecer la opsonización o la lisis por activación del complemento, ejercen funciones efectoras tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, dependiendo de la composición de la parte glicosilada del dominio Fc; esta glicosilación es un factor decisivo en la afinidad que dichas IgG poseen por los diferentes receptores Fc (FcγRs) (Quast et al., 2015).

Como se puede observar en la figura 16, la fracción glucídica de las IgG contiene un núcleo de glicanos biantenarios altamente conservado, una estructura que contiene N-acetilglucosaminas (GlcNAcs) y manosas, sin embargo, las variaciones en la glicosilación de las IgG residen en la presencia diferencial de una molécula de fucosa, de moléculas de N-acetilglucosamina y uno o dos residuos de galactosa, cada uno de los cuales puede estar cubierto por un ácido siálico terminal (Flevaris & Kontoravdi, 2022; Kaneko et al., 2006). Las IgGs específicas de los autoantígenos que carecen de galactosa y ácido siálico se relacionan con funciones proinflamatorias y con un potencial efecto autoinmune, mientras que las IgGs en presencia de galactosa y ácido siálico se relacionan con condiciones menos inflamatorias o incluso antiinflamatorias.

La activación de las células del sistema inmunitario por inmunocomplejos está determinada por el equilibrio entre la activación de los FcγRs asociados a dominios ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) y la activación

## Discusión

de los receptores Fc $\gamma$ RIIB, los cuales son inhibidores de la respuesta inflamatoria asociados a dominios ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*). Estos motivos consisten en secuencias conservadas de 4 aminoácidos que se repiten dos veces en la región intracitoplásmica de algunas proteínas de superficie celular relacionadas con la activación o inhibición del sistema inmunitario (Guilliams et al., 2014).

Por lo que además del efecto inmunomodulador ejercido por la sialización de proteínas de membrana celular previamente mencionada, la presencia o ausencia de residuos de ácido siálico en las inmunoglobulinas circulantes es un factor influyente en la respuesta inmunitaria que dichos anticuerpos desencadenan (Anthony & Ravetch, 2010; Vattepu et al., 2022).

En individuos sanos, entre el 10-15% de las IgG están sializadas, pero en respuesta a estímulos inflamatorios como pueden ser infecciones o enfermedades autoinmunes, el porcentaje de sialización de las IgG se ve reducido (Gudelj et al., 2018). Estudios funcionales han demostrado que la presencia de ácido siálico en las IgG altera la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (T. Li et al., 2017) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, *complement-dependent cytotoxicity*), provocando una disminución de la acumulación de C3b en la superficie de las células diana (Quast et al., 2015); de la misma manera, mediante técnicas de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) se ha podido cuantificar que las IgGs no sializadas muestran una eficiencia mayor en su capacidad de unión a C1q y por tanto la capacidad de activación del complemento está

favorecida en comparación con las IgGs sializadas, las cuales mostraron una afinidad de unión a C1q menor (Quast et al., 2015).

En pacientes con enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn o la artritis reumatoide, la proporción de IgG glicosiladas en el suero, se ve notablemente disminuida (D. Li et al., 2021). Durante el embarazo, se produce un aumento de la presencia de ácido siálico y galactosa en las IgG circulantes en el suero de la madre, alcanzando el nivel máximo de glicosilación de las inmunoglobulinas que se alcanza en el tercer trimestre de embarazo, reduciéndose drásticamente la glicosilación de las IgG en el postparto (van de Geijn et al., 2009). De hecho, se le atribuye un papel fundamental a la sialización y galactosilación de las IgGs, en la mejora de la sintomatología que muestran las pacientes de artritis reumatoide durante el embarazo. Se cree que durante ese periodo, las IgG muestran un patrón de glicosilación más abundante con objeto de proteger al feto frente a los anticuerpos que pudieran generarse contra el feto por parte de la madre (Förger & Østensen, 2010; Rook et al., 1991; van de Geijn et al., 2009).

Por otra parte, se ha atribuido a este mecanismo de las IgGs, el tratamiento con inmunoglobulinas de forma intravenosa o (IVIg), un producto derivado del plasma de miles de donantes sanos, muy utilizado en patologías inflamatorias por sus propiedades reguladoras. Numerosos trabajos han demostrado que la IVIg posee un potente efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Galeotti et al., 2017; D. Li et al., 2021).

Se ha especulado como el mecanismo de acción de la IVIg es dependiente del estado de activación/polarización de los macrófagos. Del mismo modo, se ha observado que el efecto desencadenado por la IVIg requiere de la presencia de receptores FcγRIIb y está mediado por la lectina tipo C SIGN-R1 o DC-SIGN en humanos (CD209), que funciona como un receptor de las IgG ricas en ácido siálico (Anthony et al., 2008; Udompornpitak et al., 2021). Las IgGs sializadas, por tanto, podrían ser las responsables de la actividad antiinflamatoria de las terapias con inmunoglobulina intravenosa (Anthony & Ravetch, 2010; Schwab et al., 2014),

En el **capítulo 1**, se demostró como las TcTs se encuentran localizadas en la superficie de las EVs tras la incubación de las EVs con proteinasa K, estando por tanto expuestas al medio extracelular durante el tiempo de vida de las EVs en el torrente circulatorio, pudiendo así catalizar la reacción de transialización durante todo el tiempo de vida de las EVs.

Este hecho podría provocar la alteración de la sialización de las IgG que acompañan y reconocen las EVs formando los ICs (EVs-IgGs), por lo que en el **capítulo 3** analizamos la respuesta mediada por los macrófagos de la cavidad peritoneal generada tras la inoculación de EVs, los ICs formados con IgGs sializadas y los ICs formados con IgGs no sializadas, con objeto de analizar el papel de la sialización de las inmunoglobulinas que forman los ICs.

La elección de los macrófagos como modelo de estudio se sustenta en el hecho que dichas células constituyen la primera barrera celular del sistema inmunitario frente a un patógeno o

frente a los productos derivados de dicho patógeno. Además, para el análisis del papel protagonizado por la sialización de las IgG que forman los ICs, los macrófagos constituyen un modelo idóneo debido a su alta presencia de receptores Fc así como de receptores siglec (Dorrington, 1976; Lübbers et al., 2018).

Como se explica en el **capítulo 3**, analizamos los cambios producidos en los macrófagos peritoneales basándonos en que constituyen unos de los modelos de macrófagos más comúnmente utilizados en estos estudios, junto con los macrófagos derivados de médula ósea.

Durante el transcurso de la enfermedad de Chagas se ha descrito la presencia de nichos de parásitos en el peritoneo, por lo que consideramos que los macrófagos peritoneales podrían protagonizar una respuesta similar a la que ocurre durante la infección (De Yarbuh et al., 2013).

Como se ha explicado previamente, existen diferentes maneras de clasificar los macrófagos, tradicionalmente se clasifican como M1 y M2, basándose en los marcadores presentes en los macrófagos, así como de la respuesta que desencadenan bien pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, respectivamente.

Por otra parte, recientemente se ha descrito la variación morfológica de las poblaciones de macrófagos peritoneales tras la inoculación de estímulos inflamatorios, como son el LPS o incluso de formas tripomastigotes de *T. cruzi*, clasificando los macrófagos peritoneales en dos subpoblaciones: i) los macrófagos peritoneales grandes (LPM, *Large Peritoneal Macrophages*) que se caracterizan por tener un tamaño mayor

(aproximadamente 12  $\mu\text{m}$  de diámetro) y con una serie de marcadores expresados como (CD11b<sup>high</sup>, F4/80<sup>high</sup>, MHC-II<sup>low</sup>).

ii) los macrófagos peritoneales pequeños (SPM, *Small Peritoneal Macrophages*), los cuales poseen un tamaño menor (aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ ) y se caracterizan por expresar diferencialmente los mismos marcadores (CD11b<sup>low</sup>, F4/80<sup>low</sup>, MHC-II<sup>high</sup>). Estas subpoblaciones de macrófagos se pueden separar por la expresión de otros marcadores (Gr-1, Ly-6c, MHC-I, AA4.1, TLR4, CD40, CD80, CD86 y CD11c), pero los anteriormente descritos fueron los usados para la separación en el **capítulo 3** de esta tesis doctoral (Bou Ghosn et al., 2010; A. dos A. Cassado et al., 2011).

Los LPM constituyen el 90% de los macrófagos peritoneales en condiciones normales, mientras que, tras la inoculación de un estímulo inflamatorio, las proporciones se invierten, siendo los SPM la subpoblación predominante en la cavidad peritoneal. Estas subpoblaciones de macrófagos provienen de orígenes diferentes, siendo los LPM de origen embrionario, concretamente, derivados del saco vitelino. Mientras que los LPM son capaces de dividirse de manera independiente a la hematopoyesis, los SPM derivan de monocitos de médula ósea. En respuesta a un estímulo inflamatorio, los LPM migran hacia el omentum, mientras que los SPM migran desde el torrente circulatorio hasta la cavidad peritoneal, haciendo que las proporciones se inviertan (A. A. Cassado et al., 2015). Debido a que la subpoblación de SPM aumenta su presencia tras la inoculación de diversos estímulos inflamatorios, se había dado por supuesto que los SPM desencadenarían una respuesta

proinflamatoria, aunque hasta nuestro trabajo, ningún otro grupo ha caracterizado la naturaleza de la respuesta inmunitaria producida por las diferentes poblaciones de estos macrófagos, en función de las interleuquinas que expresan (Bou Ghosn et al., 2010; A. dos A. Cassado et al., 2011; Ramos-Benitez et al., 2018; Takenaka et al., 2018).

En nuestro caso, como se explicó en el **capítulo 3**, en semejanza a los resultados previamente publicados la población de SPM aumentó tras los diferentes estímulos aunque excepto tras la inoculación del LPS, donde la proporción de SPM alcanzó el 92,7%, las proporciones no llegaron a invertirse totalmente respecto al grupo control de ratones inyectados con PBS (Bou Ghosn et al., 2010; A. A. Cassado et al., 2015);

Aunque en menor medida que con la inoculación de LPS, los diferentes estímulos provocaron el aumento de la proporción de SPM en la cavidad peritoneal, siendo este aumento mayor tras los estímulos con tripomastigotes (66.3%) y con ICs, tanto sializados (73.4%) como no sializados (61.5%), mientras que el incremento de la proporción de SPM fue estadísticamente menor cuando el estímulo consistió en EVs (48%).

De estos resultados pudimos extraer dos hipótesis, i) el reconocimiento de las EVs por parte de los anticuerpos favorece la fagocitosis de las EVs, lo que conlleva un aumento de la población de SPM en la cavidad peritoneal; ii) o bien, que los anticuerpos que se unen a las EVs bloquean las proteínas inmunomoduladoras de la superficie de las EVs y que describimos en el **capítulo 1**.



## Discusión

A fin de conocer las diferencias en la respuesta inducida por cada estímulo y, a diferencia de los trabajos previamente publicados por otros autores, en el **capítulo 3** realizamos la separación de las dos subpoblaciones celulares con objeto de analizar específicamente la respuesta que desencadenan ambos tipos celulares.

El análisis de los niveles de expresión de interleuquinas (ILs) mostró que ambas poblaciones celulares, son capaces de secretar ILs tanto inflamatorias como antiinflamatorias, por lo que al igual que ya había descrito Cassado y colaboradores en 2015 (A. A. Cassado et al., 2015), confirmamos que la clasificación de M1 y M2 no encaja con las características que muestran los LPM y SPM. Nuestros resultados evidencian que la respuesta desencadenada por cada subpoblación celular es dependiente de la naturaleza del estímulo, por lo que en futuros estudios donde se realice un análisis de la respuesta inmunitaria desencadenada por macrófagos peritoneales se debe caracterizar la respuesta producida tanto por los SPM como por los LPM, no limitándose únicamente al análisis de la variación de las proporciones de estas subpoblaciones. Concretamente, en el caso de las muestras de estudio analizadas en el **capítulo 3**, las ILs expresadas por cada una de las subpoblaciones (SPM y LPM) serán relevantes en la respuesta inmunitaria inducida, ya que ambas poblaciones se encuentran en una proporción considerable. A pesar de que los resultados han sido discutidos en profundidad en el **capítulo 3**, es importante diferenciar las respuestas inducidas por los estímulos empleados; en cuanto a los SPM, observamos que las EVs únicamente inducen el

aumento de la expresión de la *IL-6* y el *TNF- $\alpha$*  como citoquinas proinflamatorias, mientras que entre las citoquinas reguladoras aumentan la expresión de la *IL-10*, *IL-15* y *TGF- $\beta$* . La *IL-15* es un potente regulador autocrino de la producción de citoquinas proinflamatorias por monocitos y macrófagos, favoreciendo la producción de *IL-10* (Alleva et al., 1997). Por su parte, el aumento de la expresión de *IL-10* en los SPM regula la expresión de moléculas coestimuladoras, así como de citoquinas inflamatorias (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*, *TNF- $\alpha$*  y *IL-12*) (Saraiva & O'Garra, 2010). En la misma línea, y a pesar de que el *TGF- $\beta$*  es una citoquina pleiotrópica, en este caso parece ejercer un efecto anti-inflamatorio induciendo una respuesta tolerante, debido a la ausencia de sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias como el *IFN- $\gamma$*  o la *IL-17* (Sanjabi et al., 2009). Por lo tanto, pese al incremento de la presencia de SPM en la cavidad peritoneal tras la inoculación de EVs estos resultados sugieren un efecto inmunomodulador de las EVs, al menos durante la fase aguda inicial de la enfermedad, en ausencia de niveles suficientes de IgG que reconozcan y se unan a estas EVs para formar niveles importantes de inmunocomplejos.

Por su parte, las EVs inducen en las LPM un comportamiento similar, estimulando en esta subpoblación la expresión de *IL-6*, *TNF- $\alpha$*  así como de *IL-18* e *IFN- $\gamma$* , aunque de nuevo, estas interleuquinas inflamatorias parecen estar reguladas por la inducción de una mayor expresión de *IL-10* y *TGF- $\beta$* .

En cuanto a los ICs, observamos un cambio del perfil de citoquinas inducido respecto a las EVs libres, reforzando las

hipótesis previamente propuestas. Pese a que la presencia o ausencia de ácido siálico en las IgG no indujo cambios significativos en las proporciones de las subpoblaciones en la cavidad peritoneal, sí que desencadenó cambios en el perfil de expresión de citoquinas. Respecto a la inducción de la expresión de las citoquinas proinflamatorias, observamos que mientras que los SPM estimulados con ICs sializados solo presentaron un aumento de la expresión de la *IL-6* respecto al control, la inoculación de ICs no sializados indujo el aumento de la expresión de *IFN-γ* e *IL-18*, pero la diferencia más notoria residió en la regulación a la baja de la expresión de citoquinas antiinflamatorias.

Los SPM estimulados con ICs no sializados sufrieron la inhibición completa de la expresión de la *IL-10* e *IL-15*. La expresión del TGF- $\beta$  que se encontró muy reducida; por lo que, a diferencia de los otros estímulos, los ICs no sializados producen un fenotipo claramente proinflamatorio en los SPM, mediado principalmente por *IFN-γ* e *IL-18*. La *IL-18* es una citoquina asociada a la respuesta Th1. Berclaz y colaboradores describieron la capacidad de *IL-18* para favorecer la síntesis de *IFN-γ* y GM-CSF, induciendo la sobreexpresión de receptores Fc, lo que favorece la opsonización, fagocitosis y por tanto la inflamación (Berclaz et al., 2002).

Sin embargo, tras la estimulación con ICs sializados, los SPM parecen regular la sobreexpresión de ILs proinflamatorias con la expresión de ILs reguladoras ya que tras la estimulación con ICs sializados la expresión de *IL-10* se vió aumentada mientras que

la *IL-15* y *TGF-β*, aunque reducida, fue detectable; En la misma línea, los LPM estimulados con ICs sializados presentaron la sobreexpresión de *IL-15* e *IL-38* respecto a los LPM estimuladas con ICs no sializados. La *IL-38* está considerada como una citoquina antiinflamatoria importante, dado que inhibe la expresión de moléculas relacionadas con la respuesta Th1 (*IL-6*, *IL-1β*, *CCL5*, *TNF-α* y *CXC10*) (Pestka et al., 2004).

Estos resultados son concordantes con el papel inmunomodulador asociado a la presencia de ácido siálico en las IgG previamente explicados (Anthony & Ravetch, 2010; Vattepu et al., 2022).

El hecho de que las TcTS se encuentren en la superficie de las EVs liberadas por formas tripomastigotes, como ya hemos descrito en el **capítulo 1**, podría provocar modificaciones en el patrón de sialización de las IgG que forman los inmunocomplejos, constituyendo así un importante mecanismo de inmunomodulación que permitiría reducir la respuesta inflamatoria y permitir la supervivencia del parásito, así como modular la patología de la enfermedad de Chagas.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, resaltan la relevancia del papel protagonizado por las EVs liberadas por las formas tripomastigotes de *T. cruzi* en la supervivencia y mantenimiento del parásito en el hospedador mamífero, los cuales presentan numerosos factores de virulencia que son capaces de alterar las condiciones fisiológicas y bioquímicas de las células del hospedador con las que interactúan, preparando el nicho para nuevas infecciones, similar al nicho premetastásico

## Discusión

que inducen las EVs en enfermedades neoplásicas (Becker et al., 2016). Las modificaciones celulares ejercidas por las EVs, así como los inmunocomplejos que forman, son capaces de ejercer una modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador, favoreciendo que no se produzca una respuesta inflamatoria capaz de ejercer una respuesta tripanocida efectiva, en la que la presencia del ácido siálico juega un papel destacable.

## **8. Conclusiones**



1. Las vesículas extracelulares liberadas por las formas infectivas y no infectivas de *T. cruzi* poseen diferencias tanto a nivel proteómico como en sus propiedades nanomecánicas, que podrían explicarse por el diferente comportamiento biológico que ambas fases poseen.
2. Las vesículas extracelulares excretadas por *Trypanosoma cruzi* contienen diversas proteínas, entre las que se encuentran miembros de la superfamilia de las transialidasas. Mientras que las EVs de las formas infectantes portan 121 correspondientes a los 8 tipos en las que se clasifican, las EVs liberadas por las formas epimastigotes transportan únicamente 33 transialidasas del tipo II y enzimáticamente no activas. La presencia de dichas enzimas en las EVs debe contribuir a la virulencia, modificaciones celulares y la inmunomodulación durante la infección de *T. cruzi*.
3. La interacción de las EVs con células no infectadas induce la modificación en la expresión de 322 genes, 168 genes son sobreexpresados y 154 genes regulados a la baja. El análisis del transcriptoma sugiere que las EVs de los tripomastigotes favorecen la viabilidad del parásito en el citoplasma de la célula hospedadora, a través de la inhibición de la apoptosis y promoviendo la sobreexpresión de las proteínas que participan en el proceso de SUMOilación y ubiquitinación. Ambos efectos



## Conclusiones

favorecerían la supervivencia del parásito en el interior celular.

4. La población de macrófagos peritoneales se modificó en presencia de las EVs de *Trypanosoma cruzi*, aumentando la proporción de macrófagos pequeños (SPM) cuando fueron inoculadas EVs de *T. cruzi*, similar a lo ocurrido tras la inoculación de factores inflamatorios. Dicho aumento fue superior cuando fueron inoculados con inmunocomplejos (EVs-IgG) en lugar de la inoculación con EVs libres.
5. Las dos poblaciones de macrófagos peritoneales son capaces de expresar citoquinas inflamatorias y reguladoras. El perfil de citoquinas expresado es altamente dependiente del estímulo recibido, por lo que para analizar la respuesta producida por un inmunógeno no es suficiente con analizar la variación de las poblaciones de macrófagos en el peritoneo.
6. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral sugieren que las EVs liberadas por *T. cruzi* ejercen un papel inmunomodulador durante la fase aguda de la enfermedad.
7. La estimulación llevada a cabo con inmunocomplejos simularía la fase crónica de la enfermedad, donde los antígenos superficiales de las EVs interaccionarían con las IgG formando inmunocomplejos. La respuesta

inducida por los inmunocomplejos es altamente dependiente del estado de sialización de las IgG que forman dichos inmunocomplejos. Los inmunocomplejos formados con IgG no sializados activan una respuesta proinflamatoria mientras que los inmunocomplejos sializados inducen una respuesta reguladora.

### **Conclusión general**

Las EVs liberadas por las formas infectantes de *T. cruzi* inducen modificaciones a nivel celular en el transcriptoma de las células con las que interacciona al igual que a nivel inmunológico. Este hecho favorece la supervivencia del parásito a nivel celular y sistémico, por lo que son necesarios futuros estudios que permitan comprender la compleja interacción parásito-hospedador que permitiría diseñar estrategias de control de la patología de la enfermedad de Chagas.



## **8. Conclusions**



1. The extracellular vesicles released by the infective and non-infective forms of *T. cruzi* have differences both at the proteomic level and in their nanomechanical properties, which could be explained by the different biological behavior that both phases possess.
2. The extracellular vesicles shed by *T. cruzi* contain various proteins, including members of the trans-sialidase superfamily. While the EVs of the infecting forms carry 121 trans-sialidases corresponding to the 8 types in which they are classified, the EVs released by the epimastigote forms carry only 33, type II trans-sialidases which are not enzymatically active. The presence of these enzymes in EVs must contribute to virulence, cellular modifications and immunomodulation during *T. cruzi* infection.
3. The interaction of EVs with uninfected cells induces modification in the expression of 322 genes, 168 genes are upregulated and 154 genes are downregulated. The transcriptome analysis suggests that the EVs of trypomastigotes favour the viability of the parasite in the cytoplasm of the host cell, through the inhibition of apoptosis and promoting the overexpression of proteins that participate in SUMOylation and ubiquitination. Both effects would favour the survival of the parasite inside the cell.
4. The populations of peritoneal macrophages were modified in presence of *T. cruzi* EVs, increasing the proportion of small macrophages (SPM) when *T. cruzi* EVs were inoculated, similar to the inoculation of inflammatory factors. This increase was

## Conclusions

greater when they were inoculated with immune complexes (EVs-IgG) instead of inoculation with free EVs.

5. Both populations of peritoneal macrophages can express inflammatory and regulatory cytokines. The profile of cytokines expressed is highly dependent on the stimulus received, so in order to analyse the response produced by an immunogen it is not enough to analyse the variation of macrophage populations in the peritoneum.

6. The results obtained in this doctoral thesis suggest that EVs released by *T. cruzi* exert an immunomodulatory role during the acute phase of the disease.

7. The stimulation carried out with immune complexes would simulate the chronic phase of the disease, where the surface antigens of the EVs would interact with the IgG forming immune complexes. The response induced by immune complexes is highly dependent on the sialization of the IgG that form the immune complexes. Immune complexes formed with non-sialylated IgG activate a proinflammatory response while sialylation immune complexes induce a regulatory response.

### General conclusion

The EVs released by the infecting forms of *T. cruzi* induce modifications at the cellular level in the transcriptome of the cells with which they interact as well as at the immunological level. This fact favours the survival of the parasite at the cellular and systemic level, so future studies are necessary to understand the

complex parasite-host interaction that would allow the design of new strategies to control the Chagas disease.





## **9. Bibliografía**



- Abd Elmageed, Z. Y., Yang, Y., Thomas, R., Ranjan, M., Mondal, D., Moroz, K., Fang, Z., Rezk, B. M., Moparty, K., Sikka, S. C., Sartor, O., & Abdel-Mageed, A. B. (2014). Neoplastic Reprogramming of Patient-Derived Adipose Stem Cells by Prostate Cancer Cell-Associated Exosomes. *Stem Cells*, 32(4), 983–997. <https://doi.org/10.1002/stem.1619>
- Abdullah, M., Nakamura, T., Ferdous, T., Gao, Y., Chen, Y., Zou, K., & Michikawa, M. (2021). Cholesterol Regulates Exosome Release in Cultured Astrocytes. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.722581>
- Admyre, C., Johansson, S. M., Qazi, K. R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E. P. A., Scheynius, A., & Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1969–1978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1969>
- Agrawal, A. K., Aqil, F., Jeyabalan, J., Spencer, W. A., Beck, J., Gachuki, B. W., Alhakeem, S. S., Oben, K., Munagala, R., Bondada, S., & Gupta, R. C. (2017). Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(5), 1627–1636. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.001>
- Agustin Cueto, J., Santos Barrias, E., de Souza, W., & Silvia Romano, P. (2018). Trypanosoma cruzi invasion in non-phagocytic cells: an ultrastructural study. *BIOCELL*, 42(3), 105–108. <https://doi.org/10.32604/biocell.2018.07017>
- Ahmadi Badi, S., Moshiri, A., Fateh, A., Rahimi Jamnani, F., Sarshar, M., Vaziri, F., & Siadat, S. D. (2017). Microbiota-Derived Extracellular Vesicles as New Systemic Regulators. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01610>
- Akagi, T., & Ichiki, T. (2016). Evaluation of Zeta-Potential of Individual Exosomes Secreted from Biological Cells Using a Microcapillary Electrophoresis Chip. In *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set* (pp. 469–473). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119075691.ch37>
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H.,

- Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., & Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(3), 701-721.e70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
- Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, *113*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
- Alano, P., & Carter, R. (1990). Sexual differentiation in malaria parasites. *Annual Review of Microbiology*, *44*(1), 429–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002241>
- Aline, F., Bout, D., Amigorena, S., Roingeard, P., & Dimier-Poisson, I. (2004). Toxoplasma gondii Antigen-Pulsed-Dendritic Cell-Derived Exosomes Induce a Protective Immune Response against T. gondii Infection. *Infection and Immunity*, *72*(7), 4127–4137. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4127-4137.2004>
- Alleva, D. G., Kaser, S. B., Monroy, M. A., Fenton, M. J., & Beller, D. I. (1997). IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *159*(6), 2941–2951. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9300718>
- Almeida, I. C., & Gazzinelli, R. T. (2001). Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses. *Journal of Leukocyte Biology*, *70*(4), 467–477. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590183>
- Altcheh, J. M., & Freilij, H. (2019). *Chagas Disease*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7>
- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., & Cazzulo, J. J. (2012). The peptidases of Trypanosoma cruzi: Digestive enzymes,

- virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1824(1), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.011>
- Amon, R., Reuven, E. M., Leviatan Ben-Arye, S., & Padler-Karavani, V. (2014). Glycans in immune recognition and response. *Carbohydrate Research*, 389, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.02.004>
- Andrade, J. P. de, Marin Neto, J. A., Paola, A. A. V. de, Vilas-Boas, F., Oliveira, G. M. M., Bacal, F., Bocchi, E. A., Almeida, D. R., Fragata Filho, A. A., Moreira, M. da C. V., Xavier, S. S., Oliveira Junior, W. A. de, & Dias, J. C. P. (2011). I Diretriz Latino-Americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica: resumo executivo. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 96(6), 434–442. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011000600002>
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(9), 1135–1143. <https://doi.org/10.1084/jem.20041408>
- Andrade, D. V., Gollob, K. J., & Dutra, W. O. (2014). Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e3010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003010>
- Anguille, S., Smits, E. L., Cools, N., Goossens, H., Berneman, Z. N., & Van Tendeloo, V. F. (2009). Short-term cultured, interleukin-15 differentiated dendritic cells have potent immunostimulatory properties. *Journal of Translational Medicine*, 7(1), 109. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-109>
- Anthony, R. M., Nimmerjahn, F., Ashline, D. J., Reinhold, V. N., Paulson, J. C., & Ravetch, J. V. (2008). Recapitulation of IVIG Anti-Inflammatory Activity with a Recombinant IgG Fc. *Science*, 320(5874), 373–376. <https://doi.org/10.1126/science.1154315>
- Anthony, R. M., & Ravetch, J. V. (2010). A novel role for the IgG Fc glycan: The anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. *Journal of Clinical Immunology*, 30(SUPPL. 1), 9–14.

<https://doi.org/10.1007/s10875-010-9405-6>

- Aparicio, I. M., Scharfstein, J., & Lima, A. P. C. A. (2004). A New Cruzipain-Mediated Pathway of Human Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Requires Trypomastigote Membranes. *Infection and Immunity*, *72*(10), 5892–5902. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5892-5902.2004>
- Argibay, P. F. (2002). *Trypanosoma cruzi* surface mucin TcMuc-e2 expressed on higher eukaryotic cells induces human T cell anergy, which is reversible. *Glycobiology*, *12*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.1.25>
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., Wolozin, B., Butovsky, O., Kügler, S., & Ikezu, T. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature Neuroscience*, *18*(11), 1584–1593. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>
- Atayde, V. D., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., & Olivier, M. (2015). Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. *Cell Reports*, *13*(5), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.058>
- Atri, C., Guerfali, F., & Laouini, D. (2018). Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1801. <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>
- Atwood, J. A., Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2005). The *Trypanosoma cruzi* Proteome. *Science*, *309*(5733), 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.11110289>
- Au Yeung, C. L., Co, N.-N., Tsuruga, T., Yeung, T.-L., Kwan, S.-Y., Leung, C. S., Li, Y., Lu, E. S., Kwan, K., Wong, K.-K., Schmandt, R., Lu, K. H., & Mok, S. C. (2016). Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nature Communications*, *7*(1), 11150. <https://doi.org/10.1038/ncomms11150>
- Aung, T., Chapuy, B., Vogel, D., Wenzel, D., Oppermann, M.,

- Lahmann, M., Weinlage, T., Menck, K., Hupfeld, T., Koch, R., Trümper, L., & Wulf, G. G. (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*, *108*(37), 15336–15341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102855108>
- Avelar, L. A. A., Camilo, C. D., de Albuquerque, S., Fernandes, W. B., Gonçalves, C., Kenny, P. W., Leitão, A., McKerrow, J. H., Montanari, C. A., Orozco, E. V. M., Ribeiro, J. F. R., Rocha, J. R., Rosini, F., & Saidel, M. E. (2015). Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(7), e0003916. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003916>
- Avila, H. A., Pereira, J. B., Thiemann, O., De Paiva, E., DeGrave, W., Morel, C. M., & Simpson, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(9), 2421–2426. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.9.2421-2426.1993>
- Bafica, A., Santiago, H. C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R. T., & Sher, A. (2006). Cutting Edge: TLR9 and TLR2 Signaling Together Account for MyD88-Dependent Control of Parasitemia in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*, *177*(6), 3515–3519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3515>
- Baker, S., Polanco, J. C., & Götz, J. (2016). Extracellular Vesicles Containing P301L Mutant Tau Accelerate Pathological Tau Phosphorylation and Oligomer Formation but Do Not Seed Mature Neurofibrillary Tangles in ALZ17 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, *54*(3), 1207–1217. <https://doi.org/10.3233/JAD-160371>
- Balhuizen, M. D., Veldhuizen, E. J. A., & Haagsman, H. P. (2021). Outer Membrane Vesicle Induction and Isolation for Vaccine Development. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.629090>
- Band Horwitz, S. (1992). Mechanism of action of taxol. *Trends in*



- Pharmacological Sciences*, 13, 134–136.  
[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(92\)90048-B](https://doi.org/10.1016/0165-6147(92)90048-B)
- Barfield, C. A., Barney, R. S., Crudder, C. H., Wilmoth, J. L., Stevens, D. S., Mora-Garcia, S., Yanovsky, M. J., Weigl, B. H., & Yanovsky, J. (2011). A Highly Sensitive Rapid Diagnostic Test for Chagas Disease That Utilizes a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigen. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 58(3), 814–817.  
<https://doi.org/10.1109/TBME.2010.2087334>
- Barteneva, N. S., Maltsev, N., & Vorobjev, I. A. (2013). Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00049>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. *Biology*, 9(1).  
<https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S. P., Cordero, E. M., Marques, A. F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., Da Silveira, J. F., & Almeida, I. C. (2013). Proteomic analysis of *trypanosoma cruzi* secretome: Characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. *Journal of Proteome Research*, 12(2), 883–897. <https://doi.org/10.1021/pr300947g>
- Bayer-Santos, E., Lima, F. M., Ruiz, J. C., Almeida, I. C., & da Silveira, J. F. (2014). Characterization of the small RNA content of *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(2), 71–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.02.004>
- Beauvillain, C., Juste, M. O., Dion, S., Pierre, J., & Dimier-Poisson, I. (2009). Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*, 27(11), 1750–1757. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.022>
- Beauvillain, C., Ruiz, S., Guiton, R., Bout, D., & Dimier-Poisson, I. (2007). A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes and Infection*, 9(14–15), 1614–1622.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.07.002>

- Becker, A., Thakur, B. K., Weiss, J. M., Kim, H. S., Peinado, H., & Lyden, D. (2016). Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*, 30(6), 836–848. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.009>
- Beit-Yannai, E., Tabak, S., & Stamer, W. D. (2018). Physical exosome:exosome interactions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(3), 2001–2006. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13479>
- Berclaz, P.-Y., Shibata, Y., Whitsett, J. A., & Trapnell, B. C. (2002). GM-CSF, via PU.1, regulates alveolar macrophage FcγR-mediated phagocytosis and the IL-18/IFN-γ-mediated molecular connection between innate and adaptive immunity in the lung. *Blood*, 100(12), 4193–4200. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1102>
- Bermejo, D. A., Amezcua Vesely, M. C., Khan, M., Acosta Rodríguez, E. V., Montes, C. L., Merino, M. C., Toellner, K. M., Mohr, E., Taylor, D., Cunningham, A. F., & Gruppi, A. (2011). Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a high source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology*, 132(1), 123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03347.x>
- Bermejo, D. A., Jackson, S. W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodríguez, E. V., Amezcua-Vesely, M. C., Sather, B. D., Singh, A. K., Khim, S., Mucci, J., Liggitt, D., Campetella, O., Oukka, M., Gruppi, A., & Rawlings, D. J. (2013). Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORγt and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nature Immunology*, 14(5), 514–522. <https://doi.org/10.1038/ni.2569>
- Bernard, V., Kim, D. U., San Lucas, F. A., Castillo, J., Allenson, K., Mulu, F. C., Stephens, B. M., Huang, J., Semaan, A., Guerrero, P. A., Kamyabi, N., Zhao, J., Hurd, M. W., Koay, E. J., Taniguchi, C. M., Herman, J. M., Javle, M., Wolff, R., Katz, M., ... Alvarez, H. A. (2019). Circulating Nucleic Acids Are Associated With Outcomes of Patients With Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 156(1), 108-118.e4.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.09.022>

- Bestetti, R. B., & Muccillo, G. (1997). Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, *60*(2), 187–193. [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(97\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(97)00083-1)
- Besuschio, S. A., Llano Murcia, M., Benatar, A. F., Monnerat, S., Cruz, I., Picado, A., Curto, M. de los Á., Kubota, Y., Wehrendt, D. P., Pavia, P., Mori, Y., Puerta, C., Ndung'u, J. M., & Schijman, A. G. (2017). Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(7), e0005779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779>
- Beucher, M., & Norris, K. A. (2008). Sequence Diversity of the *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein Family. *Infection and Immunity*, *76*(2), 750–758. <https://doi.org/10.1128/IAI.01104-07>
- Bhatnagar, S., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes Released from Infected Macrophages Contain *Mycobacterium avium* Glycopeptidolipids and Are Proinflammatory. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(35), 25779–25789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702277200>
- Bilyy, R. O., Shkandina, T., Tomin, A., Muñoz, L. E., Franz, S., Antonyuk, V., Kit, Y. Y., Zirngibl, M., Fürnrohr, B. G., Janko, C., Lauber, K., Schiller, M., Schett, G., Stoika, R. S., & Herrmann, M. (2012). Macrophages Discriminate Glycosylation Patterns of Apoptotic Cell-derived Microparticles. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(1), 496–503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.273144>
- Binenbaum, Y., Fridman, E., Yaari, Z., Milman, N., Schroeder, A., Ben David, G., Shlomi, T., & Gil, Z. (2018). Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Research*, *78*(18), 5287–5299. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0124>
- Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2011). Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in

- immune responses. *Traffic*, 12(12), 1659–1668.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01225.x>
- Bojkova, D., Klann, K., Koch, B., Widera, M., Krause, D., Ciesek, S., Cinatl, J., & Münch, C. (2020). Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature*, 583(7816), 469–472. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2332-7>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borghi, S. M., Fattori, V., Conchon-Costa, I., Pinge-Filho, P., Pavanelli, W. R., & Verri, W. A. (2017). Leishmania infection: painful or painless? *Parasitology Research*, 116(2), 465–475. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5340-7>
- Bou Ghosn, E. E., Cassado, A. A., Govoni, G. R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D. M., Bortoluci, K. R., Almeida, S. R., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2568–2573.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107>
- Braga, Y. L. L., Neto, J. R. C., Costa, A. W. F., Silva, M. V. T., Silva, M. V., Celes, M. R. N., Oliveira, M. A. P., Joosten, L. A. B., Ribeiro-Dias, F., Gomes, R. S., & Machado, J. R. (2022). Interleukin-32 $\gamma$  in the Control of Acute Experimental Chagas Disease. *Journal of Immunology Research*, 2022, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2022/7070301>
- Brasil, P. E., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A. M., Sangenis, L. H., & Braga, J. U. (2010). ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 10(1), 337. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-337>
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory.

- PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004792.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>
- Brossas, J.-Y., Gulin, J. E. N., Bisio, M. M. C., Chapelle, M., Marinach-Patrice, C., Bordessoules, M., Palazon Ruiz, G., Vion, J., Paris, L., Altcheh, J., & Mazier, D. (2017). Secretome analysis of *Trypanosoma cruzi* by proteomics studies. *PLOS ONE*, 12(10), e0185504.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185504>
- Bruno, S., Grange, C., Collino, F., Deregibus, M. C., Cantaluppi, V., Biancone, L., Tetta, C., & Camussi, G. (2012). Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury. *PLoS ONE*, 7(3), e33115.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033115>
- Budnik, V., Ruiz-Cañada, C., & Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3), 160–172.  
<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.29>
- Burgos, J. M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Bruses, B., Favaloro, L., Leguizamón, M. S., Lucero, R. H., Laguens, R., Levin, M. J., Favaloro, R., & Schijman, A. G. (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), 485–495. <https://doi.org/10.1086/655680>
- Burtoloso, A. C. B., de Albuquerque, S., Furber, M., Gomes, J. C., Gonçalves, C., Kenny, P. W., Leitão, A., Montanari, C. A., Quilles, J. C., Ribeiro, J. F. R., & Rocha, J. R. (2017). Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), e0005343.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005343>
- Bustamante Zamora, D. M., Hernández, M. M., Torres, N., de Abrego, V., Monroy Escobar, M. C., Zúniga, C., & Sosa, W. (2015). Information to Act: Household Characteristics are Predictors of Domestic Infestation with the Chagas Vector *Triatoma dimidiata* in Central America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93(1), 97–107.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0596>

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cai, H., Reinisch, K., & Ferro-Novick, S. (2007). Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Developmental Cell*, 12(5), 671–682.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.005>
- Campelo, R., Díaz Lozano, I., Figarella, K., Osuna, A., & Ramírez, J. L. (2015). Leishmania major Telomerase TERT Protein Has a Nuclear/Mitochondrial Eclipsed Distribution That Is Affected by Oxidative Stress. *Infection and Immunity*, 83(1), 57–66. <https://doi.org/10.1128/IAI.02269-14>
- Campetella, O., Buscaglia, C. A., Mucci, J., & Leguizamón, M. S. (2020). Parasite-host glycan interactions during Trypanosoma cruzi infection: trans-Sialidase rides the show. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165692.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165692>
- Campos, M. A. S., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procópio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., & Gazzinelli, R. T. (2001). Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. *The Journal of Immunology*, 167(1), 416–423.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>
- Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., & Bartholomeu, D. C. (2016). Evasion of the Immune Response by Trypanosoma cruzi during Acute Infection. *Frontiers in Immunology*, 6.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>
- Carvalho, S. T., Sola-Penna, M., Oliveira, I. A., Pita, S., Goncalves, A. S., Neves, B. C., Sousa, F. R., Freire-de-Lima, L., Kuroguchi, M., Hinou, H., Nishimura, S.-I.,

## Bibliografía

- Mendonca-Previato, L., Previato, J. O., & Todeschini, A. R. (2010). A new class of mechanism-based inhibitors for *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and their influence on parasite virulence. *Glycobiology*, *20*(8), 1034–1045. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq065>
- Cassado, A. A., D'Império Lima, M. R., & Bortoluci, K. R. (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. *Frontiers in Immunology*, *6*(MAY), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225>
- Cassado, A. dos A., de Albuquerque, J. A. T., Sardinha, L. R., Buzzo, C. de L., Faustino, L., Nascimento, R., Ghosn, E. E. B., D'Império Lima, M. R., Alvarez, J. M. M., & Bortoluci, K. R. (2011). Cellular Renewal and Improvement of Local Cell Effector Activity in Peritoneal Cavity in Response to Infectious Stimuli. *PLoS ONE*, *6*(7), e22141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022141>
- Castaño, C., Kalko, S., Novials, A., & Párrizas, M. (2018). Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(48), 12158–12163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808855115>
- Castanys, S., Osuna, A., Gamarro, F., & Ruiz-Perez, L. M. (1984). Purification of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* by Percoll discontinuous gradient centrifugation. *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research*, *70*(4), 443–449. <https://doi.org/10.1007/BF00926684>
- Castro, J. T., Brito, R., Hojo-Souza, N. S., Azevedo, B., Salazar, N., Ferreira, C. P., Junqueira, C., Fernandes, A. P., Vasconcellos, R., Cardoso, J. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Vieira, P. M. A., Carneiro, C. M., Valiate, B., Toledo, C., Salazar, A. M., Caballero, O., Lannes-Vieira, J., Teixeira, S. R., ... Gazzinelli, R. T. (2023). ASP-2/Trans-sialidase chimeric protein induces robust protective immunity in experimental models of Chagas' disease. *Npj Vaccines*, *8*(1), 81. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00676-0>
- Cataldi, M., Vigliotti, C., Mosca, T., Cammarota, M., & Capone, D. (2017). Emerging Role of the Spleen in the Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, Nanoparticles and Exosomes. *International Journal of Molecular Sciences*,

- 18(6), 1249. <https://doi.org/10.3390/ijms18061249>
- Cestari, I., Ansa-Addo, E., Deolindo, P., Inal, J. M., & Ramirez, M. I. (2012). Trypanosoma cruzi Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles . *The Journal of Immunology*, 188(4), 1942–1952. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102053>
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>
- Chang, C. S., & Chang, K. P. (1986). Monoclonal antibody affinity purification of a Leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(1), 100–104. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.1.100>
- Chargaff, E., & West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *Journal of Biological Chemistry*, 166(1), 189–197. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34997-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34997-9)
- Chaves, J., Ferri, R. G., Kliemann, T. A., Irulegui, I., & de Souza, H. B. (1979). Circulating immune complexes in experimental Chagas' disease. Identification of parasitic antigens in the complexes. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 21(2), 77–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/113861>
- Chaves, J., Mariano, O. N., de Souza, H. B., Irulegui, I., & Vaz, C. A. (1982). Deposition of immune complexes in experimental Chagas' disease. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 24(1), 11–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6214838>
- Chen, C., Luo, Y., He, W., Zhao, Y., Kong, Y., Liu, H., Zhong, G., Li, Y., Li, J., Huang, J., Chen, R., & Lin, T. (2019). Exosomal long noncoding RNA LNMAT2 promotes lymphatic metastasis in bladder cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 130(1), 404–421. <https://doi.org/10.1172/JCI130892>



## Bibliografía

- Chen, C., Yu, H., Han, F., Lai, X., Ye, K., Lei, S., Mai, M., Lai, M., & Zhang, H. (2022). Tumor-suppressive circRHOBTB3 is excreted out of cells via exosome to sustain colorectal cancer cell fitness. *Molecular Cancer*, 21(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01511-1>
- Chen, C., Zheng, H., Luo, Y., Kong, Y., An, M., Li, Y., He, W., Gao, B., Zhao, Y., Huang, H., Huang, J., & Lin, T. (2021). SUMOylation promotes extracellular vesicle-mediated transmission of lncRNA ELNAT1 and lymph node metastasis in bladder cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 131(8). <https://doi.org/10.1172/JCI146431>
- Chen, G.-Y., Brown, N. K., Zheng, P., & Liu, Y. (2014). Siglec-G/10 in self-nonsel self discrimination of innate and adaptive immunity. *Glycobiology*, 24(9), 800–806. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu068>
- Chen, L., Li, C., Peng†, Z., Zhao†, J., Gong‡, G., & Tan, D. (2013). miR-197 Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Hepatitis B Virus-Infected Patients. *Gut and Liver*, 7(3), 335–342. <https://doi.org/10.5009/gnl.2013.7.3.335>
- Chen, W., Liu, X., Lv, M., Chen, L., Zhao, J., Zhong, S., Ji, M., Hu, Q., Luo, Z., Wu, J., & Tang, J. (2014). Exosomes from Drug-Resistant Breast Cancer Cells Transmit Chemoresistance by a Horizontal Transfer of MicroRNAs. *PLoS ONE*, 9(4), e95240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095240>
- Cheng, L., Sharples, R. A., Scicluna, B. J., & Hill, A. F. (2014). Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23743. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23743>
- Cheng, Y., & Schorey, J. S. (2013). Exosomes carrying mycobacterial antigens can protect mice against Mycobacterium tuberculosis infection. *European Journal of Immunology*, 43(12), 3279–3290. <https://doi.org/10.1002/eji.201343727>
- Chiang, C., Coukos, G., & Kandalaft, L. (2015). Whole Tumor Antigen Vaccines: Where Are We? *Vaccines*, 3(2), 344–372.

<https://doi.org/10.3390/vaccines3020344>

- Choi, D., Kim, D., Kim, Y., & Gho, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*, *13*(10–11), 1554–1571. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200329>
- Choi, Y. H., & Yoo, Y. H. (2012). Taxol-induced growth arrest and apoptosis is associated with the upregulation of the Cdk inhibitor, p21WAF1/CIP1, in human breast cancer cells. *Oncology Reports*, *28*(6), 2163–2169. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2060>
- Chuenkova, M. V., & PereiraPerrin, M. (2005). A Synthetic Peptide Modeled on PDNF, Chagas' Disease Parasite Neurotrophic Factor, Promotes Survival and Differentiation of Neuronal Cells through TrkA Receptor. *Biochemistry*, *44*(48), 15685–15694. <https://doi.org/10.1021/bi0512039>
- Ciravolo, V., Huber, V., Ghedini, G. C., Venturelli, E., Bianchi, F., Campiglio, M., Morelli, D., Villa, A., Mina, P. Della, Menard, S., Filipazzi, P., Rivoltini, L., Tagliabue, E., & Pupa, S. M. (2012). Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *Journal of Cellular Physiology*, *227*(2), 658–667. <https://doi.org/10.1002/jcp.22773>
- Citterio, B., Albertini, M. C., Ghibelli, L., Falcieri, E., Battistelli, M., Canonico, B., Rocchi, M. B. L., Teodori, L., Ciani, M., & Piatti, E. (2015). Multiparameter analysis of apoptosis in puromycin-treated *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, *197*(6), 773–780. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1110-7>
- Claassen, I., Meylis, J., van der Ley, P., Peeters, C., Brons, H., Robert, J., Borsboom, D., van der Ark, A., van Straaten, I., Roholl, P., Kuipers, B., & Poolman, J. (1996). Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine*, *14*(10), 1001–1008. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(96\)00020-5](https://doi.org/10.1016/0264-410X(96)00020-5)
- Coma, G., Peña, R., Blanco, J., Rosell, A., Borrás, F. E., Esté, J. A., Clotet, B., Ruiz, L., Parkhouse, R. M. E., & Bofill, M. (2006). Treatment of monocytes with interleukin (IL)-12 plus

- IL-18 stimulates survival, differentiation and the production of CXC chemokine ligands (CXCL)8, CXCL9 and CXCL10. *Clinical and Experimental Immunology*, 145(3), 535–544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03145.x>
- Corbett, C. E. P., Ribeiro, U., Prianti, M. das G., Habr-Gama, A., Okumura, M., & Gama-Rodrigues, J. (2001). Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic chagas' disease. *Diseases of the Colon & Rectum*, 44(7), 993–998. <https://doi.org/10.1007/BF02235488>
- Corral, R., Freilij, H., & Grinstein, S. (1987). Specific circulating immune complexes in acute chagas' disease. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 29(1), 26–32. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651987000100004>
- Correa, R., Coronado, L., Caballero, Z., Faral-Tello, P., Robello, C., & Spadafora, C. (2019). Extracellular vesicles carrying lactate dehydrogenase induce suicide in increased population density of Plasmodium falciparum in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 5042. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41697-x>
- Cortes-Serra, N., Gualdrón-Lopez, M., Pinazo, M.-J., Torrecilhas, A. C., & Fernandez-Becerra, C. (2022). Extracellular Vesicles in Trypanosoma cruzi Infection: Immunomodulatory Effects and Future Perspectives as Potential Control Tools against Chagas Disease. *Journal of Immunology Research*, 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2022/5230603>
- Costa, R. S., Monteiro, R. C., Lehuen, A., Joskowicz, M., Noël, L.-H., & Droz, D. (1991). Immune complex-mediated glomerulopathy in experimental Chagas' disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 58(1), 102–114. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(91\)90152-Z](https://doi.org/10.1016/0090-1229(91)90152-Z)
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(suppl 1), 113–122. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000900018>
- Coura, J. R. (2015). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias Do Instituto Oswaldo*

- Cruz*, 110(3), 277–282. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>
- Coura, J. R., & Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465(S7301), S6–S7. <https://doi.org/10.1038/nature09221>
- Crompton, E., Van Damme, M., Pieters, K., Vermeersch, M., Perez-Morga, D., Mineur, P., Maerevoet, M., Meuleman, N., Bron, D., Lagneaux, L., & Stamatopoulos, B. (2017). Extracellular vesicles of bone marrow stromal cells rescue chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis, enhance their migration and induce gene expression modifications. *Haematologica*, 102(9), 1594–1604. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.163337>
- Cronemberger-Andrade, A., Xander, P., Soares, R. P., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Ellis, C. C., Grajeda, B., Ofir-Birin, Y., Almeida, I. C., Regev-Rudzki, N., & Torrecilhas, A. C. (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(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00099>
- Cuevas, I. C., Cazzulo, J. J., & Sánchez, D. O. (2003). gp63 Homologues in Trypanosoma cruzi : Surface Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection. *Infection and Immunity*, 71(10), 5739–5749. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5739-5749.2003>
- Cura, C. I., Mejía-Jaramillo, A. M., Duffy, T., Burgos, J. M., Rodriguero, M., Cardinal, M. V., Kjos, S., Gurgel-Gonçalves, R., Blanchet, D., De Pablos, L. M., Tomasini, N., da Silva, A., Russomando, G., Cuba, C. A. C., Aznar, C., Abate, T., Levin, M. J., Osuna, A., Gürtler, R. E., ... Schijman, A. G. (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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.006>
- D'Avila, H., Freire-de-Lima, C. G., Roque, N. R., Teixeira, L., Barja-Fidalgo, C., Silva, A. R., Melo, R. C. N., DosReis, G. A., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2011). Host

- Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. *The Journal of Infectious Diseases*, 204(6), 951–961.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jir432>
- da Silva, A. A., Teixeira, T. L., Teixeira, S. C., Machado, F. C., dos Santos, M. A., Tomiosso, T. C., Tavares, P. C. B., Brígido, R. T. e S., Martins, F. A., Silva, N. S. de L., Rodrigues, C. C., Roque-Barreira, M. C., Mortara, R. A., Lopes, D. S., Ávila, V. de M. R., & Silva, C. V. da. (2017). Galectin-3: A Friend but Not a Foe during *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00463>
- Da Silveira, J. F., Abrahamsohn, P. A., & Colli, W. (1979). Plasma membrane vesicles isolated from epimastigote forms of *trypanosoma cruzi*. *BBA - Biomembranes*, 550(2), 222–232. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90209-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90209-8)
- Dalton, A. J. (1975). Microvesicles and Vesicles of Multivesicular Bodies Versus “Virus-Like” Particles. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 54(5), 1137–1148.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/54.5.1137>
- Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>
- de Lederkremer, R. M., & Agusti, R. (2009). *Glycobiology of Trypanosoma cruzi* (pp. 311–366).  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(09\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(09)00007-9)
- de Lederkremer, R. M., Giorgi, M. E., & Agusti, R. (2022). trans - Sialylation: a strategy used to incorporate sialic acid into oligosaccharides. *RSC Chemical Biology*, 3(2), 121–139.  
<https://doi.org/10.1039/D1CB00176K>
- De Pablos, L. M., Díaz Lozano, I. M., Jercic, M. I., Quinzada, M., Giménez, M. J., Calabuig, E., Espino, A. M., Schijman, A. G., Zulantay, I., Apt, W., & Osuna, A. (2016). The C-terminal

- region of *Trypanosoma cruzi* MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. *Scientific Reports*, 6(1), 27293. <https://doi.org/10.1038/srep27293>
- De Pablos, L. M., González, G. G., Solano Parada, J., Seco Hidalgo, V., Díaz Lozano, I. M., Gómez Samblás, M. M., Cruz Bustos, T., & Osuna, A. (2011). Differential Expression and Characterization of a Member of the Mucin-Associated Surface Protein Family Secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*, 79(10), 3993–4001. <https://doi.org/10.1128/IAI.05329-11>
- De Pablos, L. M., & Osuna, A. (2012). Multigene Families in *Trypanosoma cruzi* and Their Role in Infectivity. *Infection and Immunity*, 80(7), 2258–2264. <https://doi.org/10.1128/IAI.06225-11>
- de Pablos Torró, L. M., Retana Moreira, L., & Osuna, A. (2018). Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01190>
- de Souza, E. M., Araújo-Jorge, T. C., Bailly, C., Lansiaux, A., Batista, M. M., Oliveira, G. M., & Soeiro, M. N. C. (2003). Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in in vitro and in vivo models. *Cell and Tissue Research*, 314(2), 223–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0782-5>
- De Yarbuh, A. L., Cáceres, K., Sulbarán, D., Araujo, S., Moreno, E., Carrasco, H. J., Colasante, C., Mogollón, N., & Alarcón, M. (2013). Proliferación de *Trypanosoma cruzi* en la membrana peritoneal y líquido ascítico de ratones con infección aguda. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 53(2), 146–156.
- Del Nery, E., Juliano, M. A., Lima, A. P. C. A., Scharfstein, J., & Juliano, L. (1997). Kininogenase Activity by the Major Cysteiny Proteinase (Cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25713–25718. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25713>
- Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J.-F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D. B., Sarkar, S. N., Morelli, A. E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2013). Human

- placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 12048–12053.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110>
- Deng, F., & Miller, J. (2019). A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *Journal of Histotechnology*, 42(4), 226–239. <https://doi.org/10.1080/01478885.2019.1646984>
- Deng, Z., Poliakov, A., Hardy, R. W., Clements, R., Liu, C., Liu, Y., Wang, J., Xiang, X., Zhang, S., Zhuang, X., Shah, S. V., Sun, D., Michalek, S., Grizzle, W. E., Garvey, T., Mobley, J., & Zhang, H.-G. (2009). Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance. *Diabetes*, 58(11), 2498–2505.  
<https://doi.org/10.2337/db09-0216>
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Magnenat, E., Vilbois, F., Hochmann, A., Journot, L., Antonsson, B., & Martinou, J.-C. (2001). Phosphorylation of Bid by Casein Kinases I and II Regulates Its Cleavage by Caspase 8. *Molecular Cell*, 8(3), 601–611.  
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00335-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00335-5)
- Dias-Guerreiro, T., Palma-Marques, J., Mourata-Gonçalves, P., Alexandre-Pires, G., Valério-Bolas, A., Gabriel, Á., Nunes, T., Antunes, W., Fonseca, I. P. da, Sousa-Silva, M., & Santos-Gomes, G. (2021). African Trypanosomiasis: Extracellular Vesicles Shed by *Trypanosoma brucei brucei* Manipulate Host Mononuclear Cells. *Biomedicines*, 9(8), 1056. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081056>
- Díaz Lozano, I. M., De Pablos, L. M., Longhi, S. A., Zago, M. P., Schijman, A. G., & Osuna, A. (2017). Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Scientific Reports*, 7(1), 44451.  
<https://doi.org/10.1038/srep44451>
- Dienz, O., Eaton, S. M., Bond, J. P., Neveu, W., Moquin, D., Noubade, R., Briso, E. M., Charland, C., Leonard, W. J., Ciliberto, G., Teuscher, C., Haynes, L., & Rincon, M. (2009). The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *Journal of*

- Experimental Medicine*, 206(1), 69–78.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20081571>
- Dinarello, C. A. (2001). Novel targets for interleukin 18 binding protein. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60(suppl 3), iii18–iii24. <https://doi.org/10.1136/ard.60.90003.iii18>
- Domingues, P., Golebiowski, F., Tatham, M. H., Lopes, A. M., Taggart, A., Hay, R. T., & Hale, B. G. (2015). Global Reprogramming of Host SUMOylation during Influenza Virus Infection. *Cell Reports*, 13(7), 1467–1480.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.001>
- Dorn, P. L., Melgar, S., Rouzier, V., Gutierrez, A., Combe, C., Rosales, R., Rodas, A., Kott, S., Salvia, D., & Monroy, C. M. (2003). The Chagas Vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:Reduviidae), is Panmictic within and Among Adjacent Villages in Guatemala : Table 1. *Journal of Medical Entomology*, 40(4), 436–440. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.4.436>
- Dorrington, K. J. (1976). Properties of the Fc Receptor on Macrophages and Monocytes. *Immunological Communications*, 5(4), 263–280.  
<https://doi.org/10.3109/08820137609044280>
- Dragovic, R. A., Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., Redman, C. W. G., Harris, A. L., Dobson, P. J., Harrison, P., & Sargent, I. L. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 780–788.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>
- Dwivedi, S., Agarwal, R., Tripathi, A., Agrawal, R., Vasudeva, A., Misra, R., Shrivastava, V., Kishore, S., & Misra, S. (2022). Biotechnology for diagnosis, prognosis, and monitoring cancer. In *Biotechnology in Healthcare* (pp. 49–69). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90042-3.00004-9>
- Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A., & Mosser, D. M. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(6), 1298–1307.



<https://doi.org/10.1189/jlb.0406249>

Eifler, K., & Vertegaal, A. C. O. (2015). SUMOylation-Mediated Regulation of Cell Cycle Progression and Cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(12), 779–793.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.09.006>

Ekström, E. J., Bergenfelz, C., von Bülow, V., Serifler, F., Carlemalm, E., Jönsson, G., Andersson, T., & Leandersson, K. (2014). WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells. *Molecular Cancer*, 13(1), 88.

<https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-88>

El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Åslund, L., Attipoe, P., ... Andersson, B. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309(5733), 409–415.

<https://doi.org/10.1126/science.1112631>

Elliott, R. O., & He, M. (2021). Unlocking the Power of Exosomes for Crossing Biological Barriers in Drug Delivery.

*Pharmaceutics*, 13(1), 122.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010122>

Etayash, H., McGee, A. R., Kaur, K., & Thundat, T. (2016). Nanomechanical sandwich assay for multiple cancer biomarkers in breast cancer cell-derived exosomes.

*Nanoscale*, 8(33), 15137–15141.

<https://doi.org/10.1039/C6NR03478K>

Falcioni, T., Papa, S., Campana, R., Manti, A., Battistelli, M., & Baffone, W. (2008). State transitions of *Vibrio parahaemolyticus* VBNC cells evaluated by flow cytometry.

*Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 74B(5), 272–281.

<https://doi.org/10.1002/cyto.b.20427>

Falker, C., Hartmann, A., Guett, I., Dohler, F., Altmepfen, H., Betzel, C., Schubert, R., Thurm, D., Wegwitz, F., Joshi, P., Verderio, C., Krasemann, S., & Glatzel, M. (2016). Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity.

- Journal of Neurochemistry*, 137(1), 88–100.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.13514>
- Feliciangeli, M. D., Campbell-Lendrum, D., Martinez, C., Gonzalez, D., Coleman, P., & Davies, C. (2003). Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. *Trends in Parasitology*, 19(1), 44–49.  
[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00013-2)
- Fernandes, M. C., & Andrews, N. W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 734–747.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>
- Fitts, C. A., Ji, N., Li, Y., & Tan, C. (2019). Exploiting Exosomes in Cancer Liquid Biopsies and Drug Delivery. *Advanced Healthcare Materials*, 8(6), 1801268.  
<https://doi.org/10.1002/adhm.201801268>
- Flevaris, K., & Kontoravdi, C. (2022). Immunoglobulin G N-glycan Biomarkers for Autoimmune Diseases: Current State and a Glycoinformatics Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5180.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23095180>
- Fonseca, L. M. da, da Costa, K. M., Chaves, V. de S., Freire-de-Lima, C. G., Morrot, A., Mendonça-Previato, L., Previato, J. O., & Freire-de-Lima, L. (2019). Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma Cruzi* Transsialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. *Frontiers in Immunology*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00164>
- Förger, F., & Østensen, M. (2010). Is IgG galactosylation the relevant factor for pregnancy-induced remission of rheumatoid arthritis? *Arthritis Research & Therapy*, 12(1), 108. <https://doi.org/10.1186/ar2919>
- Forrest, D. M., Batista, M., Marchini, F. K., Tempone, A. J., & Traub-Csekö, Y. M. (2020). Proteomic analysis of exosomes derived from procyclic and metacyclic-like cultured *Leishmania infantum chagasi*. *Journal of Proteomics*, 227, 103902. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103902>
- Foster, B. P., Balassa, T., Benen, T. D., Dominovic, M.,

- Elmadjian, G. K., Florova, V., Fransolet, M. D., Kestlerova, A., Kmiecik, G., Kostadinova, I. A., Kyvelidou, C., Meggyes, M., Mincheva, M. N., Moro, L., Pastuschek, J., Spoldi, V., Wandernoth, P., Weber, M., Toth, B., & Markert, U. R. (2016). Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 53(6), 379–395.  
<https://doi.org/10.1080/10408363.2016.1190682>
- Frampton, A. E., Prado, M. M., López-Jiménez, E., Fajardo-Puerta, A. B., Jawad, Z. A. R., Lawton, P., Giovannetti, E., Habib, N. A., Castellano, L., Stebbing, J., Krell, J., & Jiao, L. R. (2018). Glypican-1 is enriched in circulating-exosomes in pancreatic cancer and correlates with tumor burden. *Oncotarget*, 9(27), 19006–19013.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24873>
- Freire-de-Lima, L., Alisson-Silva, F., Carvalho, S. T., Takiya, C. M., Rodrigues, M. M., DosReis, G. A., Mendonça-Previato, L., Previato, J. O., & Todeschini, A. R. (2010). Trypanosoma cruzi Subverts Host Cell Sialylation and May Compromise Antigen-specific CD8+ T Cell Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), 13388–13396.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096305>
- Freire-De-Lima, L., Fonseca, L. M., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L., & Previato, J. O. (2015). The trans-sialidase, the major Trypanosoma cruzi virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology*, 25(11), 1142–1149.  
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057>
- Freitas, E. C., Oliveira, M. de F., Vasconcelos, A. S. O. de B., Silva Filho, J. D. da, Viana, C. E. M., Gomes, K. C. M. S., & Cavalcanti, L. P. de G. (2017). Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in Northeastern Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(1), 44–51.  
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0242-2016>
- Freitas, L. M., dos Santos, S. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Mendes, T. A. O., Rodrigues, T. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, S. M. R., Fujiwara, R. T., & Bartholomeu, D. C. (2011). Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the

- Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity. *PLoS ONE*, 6(10), e25914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025914>
- Fritah, S., Niclou, S. P., & Azuaje, F. (2014). Databases for lncRNAs: a comparative evaluation of emerging tools. *RNA*, 20(11), 1655–1665. <https://doi.org/10.1261/rna.044040.113>
- Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R., & Stevens, M. M. (2015). Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release*, 205, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.029>
- Galeotti, C., Kaveri, S. V, & Bayry, J. (2017). IVIG-mediated effector functions in autoimmune and inflammatory diseases. *International Immunology*, 29(11), 491–498. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx039>
- Gao, W., & Pereira, M. A. (2002). Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 32(2), 167–170. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00322-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00322-8)
- Gao, W., Wortis, H. H., & Pereira, M. A. (2002). The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *International Immunology*, 14(3), 299–308. <https://doi.org/10.1093/intimm/14.3.299>
- Garcia-Silva, M. R., Cabrera-Cabrera, F., Cura Das Neves, R. F., Souto-Padrón, T., De Souza, W., & Cayota, A. (2014). Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed Microvesicles in mammalian host cells: Relevance of tRNA-derived halves. *BioMed Research International*, 2014, 305239. <https://doi.org/10.1155/2014/305239>
- Garcia-Silva, M. R., Cura das Neves, R. F., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., Naya, H., Fernandez-Calero, T., Souto-Padron, T., de Souza, W., & Cayota, A. (2014). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, 113(1), 285–304.

<https://doi.org/10.1007/s00436-013-3655-1>

García, G. A., Joensen, L. G., Búa, J., Ainciart, N., Perry, S. J., & Ruiz, A. M. (2003). Trypanosoma cruzi: Molecular identification and characterization of new members of the Tc13 family. Description of the interaction between the Tc13 antigen from Tulahuén strain and the second extracellular loop of the  $\beta$ 1-adrenergic receptor. *Experimental Parasitology*, 103(3–4), 112–119. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00087-0)

Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J.-C., & Schifferli, J. ü. A. (2003). Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Experimental Cell Research*, 285(2), 243–257. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00055-7)

Geiger, A., Hirtz, C., Bécue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., Rossignol, M., Cuny, G., & Peltier, J.-B. (2010). Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma. *BMC Microbiology*, 10(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-20>

Gerritzen, M. J. H., Martens, D. E., Wijffels, R. H., van der Pol, L., & Stork, M. (2017). Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnology Advances*, 35(5), 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.003>

Giri, P. K., & Schorey, J. S. (2008). Exosomes Derived from M. Bovis BCG Infected Macrophages Activate Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 3(6), e2461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002461>

Glass, I. R., Santos, A. D. dos, Varjão, A. E. L., Costa, I. S., Correia, D., & Silva, Â. M. (2018). Clinical and epidemiological characteristics of Chagas disease in an endemic area of Sergipe State, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(5), 660–664. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0067-2018>

Gluezn, E., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2007). The Trypanosoma cruzi metacyclic-specific protein Met-III associates with the nucleolus and contains independent amino and carboxyl terminal targeting elements.

- International Journal for Parasitology*, 37(6), 617–625.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.016>
- Gómez-Ochoa, S. A., Rojas, L. Z., Echeverría, L. E., Muka, T., & Franco, O. H. (2022). Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Global Heart*, 17(1), 59. <https://doi.org/10.5334/gh.1150>
- Gomez-Samblas, M., Bernal, D., Bolado-Ortiz, A., Vilchez, S., Bolás-Fernández, F., Espino, A. M., Trelis, M., & Osuna, A. (2018). Intraperitoneal administration of the anti-IL-23 antibody prevents the establishment of intestinal nematodes in mice. *Scientific Reports*, 8(1), 7787. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26194-x>
- Gómez, L. A., Gutierrez, F. R. S., & Peñuela, O. A. (2019). Trypanosoma cruzi infection in transfusion medicine. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 41(3), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.12.001>
- Gonçalves, R. L. S., Barreto, R. F. S. M., Polycarpo, C. R., Gadelha, F. R., Castro, S. L., & Oliveira, M. F. (2011). A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 43(6), 651–661. <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9398-8>
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 3(1), 23–35. <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Gresnigt, M. S., Rösler, B., Jacobs, C. W. M., Becker, K. L., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Netea, M. G., Dinarello, C. A., & van de Veerdonk, F. L. (2013). The IL-36 receptor pathway regulates Aspergillus fumigatus- induced Th1 and Th17 responses. *European Journal of Immunology*, 43(2), 416–426. <https://doi.org/10.1002/eji.201242711>
- Groot, M., & Lee, H. (2020). Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells*, 9(4), 1044. <https://doi.org/10.3390/cells9041044>
- Guay, C., & Regazzi, R. (2017). Exosomes as new players in

- metabolic organ cross-talk. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 19, 137–146.  
<https://doi.org/10.1111/dom.13027>
- Gudelj, I., Lauc, G., & Pezer, M. (2018). Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology*, 333, 65–79. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.009>
- Guedes, P. M. M., Gutierrez, F. R. S., Silva, G. K., Dellalibera-Joviliano, R., Rodrigues, G. J., Bendhack, L. M., Rassi, A., Rassi, A., Schmidt, A., Maciel, B. C., Marin Neto, J. A., & Silva, J. S. (2012). Deficient Regulatory T Cell Activity and Low Frequency of IL-17-Producing T Cells Correlate with the Extent of Cardiomyopathy in Human Chagas' Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(4), e1630.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001630>
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2014). The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 14(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/nri3582>
- Gulbins, E., & Kolesnick, R. (2003). Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene*, 22(45), 7070–7077.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207146>
- Gürtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Petersen, R. M., Chuit, R., Segura, E. L., & Cohen, J. E. (2005). Incidence of trypanosoma cruzi infection among children following domestic reinfestation after insecticide spraying in rural northwestern Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(1), 95–103.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014842>
- Gurunathan, S., Kang, M.-H., Qasim, M., Khan, K., & Kim, J.-H. (2021). Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles. *International Journal of Nanomedicine, Volume 16*, 3357–3383. <https://doi.org/10.2147/IJN.S310357>
- Hamilton, P. B., & Stevens, J. R. (2017). Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 321–344). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00015-0>

- Han, Q. F., Li, W. J., Hu, K. S., Gao, J., Zhai, W. L., Yang, J. H., & Zhang, S. J. (2022). Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular Cancer*, 21(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>
- Han, S., & Rhee, W. J. (2018). Inhibition of apoptosis using exosomes in Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(5), 1331–1339. <https://doi.org/10.1002/bit.26549>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology*, 97(2), 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Hassani, K., & Olivier, M. (2013). Immunomodulatory Impact of Leishmania-Induced Macrophage Exosomes: A Comparative Proteomic and Functional Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2185. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002185>
- Hassani, K., Shio, M. T., Martel, C., Faubert, D., & Olivier, M. (2014). Absence of Metalloprotease GP63 Alters the Protein Content of Leishmania Exosomes. *PLoS ONE*, 9(4), e95007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095007>
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). Trypanosoma Cruzi Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes*, 11(10), 1196. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>
- Holst, J., Martin, D., Arnold, R., Huergo, C. C., Oster, P., O'Hallahan, J., & Rosenqvist, E. (2009). Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from Neisseria meningitidis. *Vaccine*, 27, B3–B12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.04.071>
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di



- Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmer, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., ... Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, *527*(7578), 329–335. <https://doi.org/10.1038/nature15756>
- Hotez, P., Bottazzi, M. E., Strub-Wourgaft, N., Sosa-Estani, S., Torrico, F., Pajín, L., Abril, M., & Sancho, J. (2020). A new patient registry for Chagas disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(10), e0008418. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008418>
- Hurley, J. H. (2010). The ESCRT complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *45*(6), 463–487. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516>
- Ikonen, E., & Zhou, X. (2021). Cholesterol transport between cellular membranes: A balancing act between interconnected lipid fluxes. *Developmental Cell*, *56*(10), 1430–1436. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.04.025>
- Jaiswal, S., Jamieson, C. H. M., Pang, W. W., Park, C. Y., Chao, M. P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N., & Weissman, I. L. (2009). CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell*, *138*(2), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.046>
- Jansen, F., & Li, Q. (2017). *Exosomes as Diagnostic Biomarkers in Cardiovascular Diseases* (pp. 61–70). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-4397-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4397-0_4)
- Jenjaroenpun, P., Kremenska, Y., Nair, V. M., Kremensky, M., Joseph, B., & Kurochkin, I. V. (2013). Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ*, *1*, e201. <https://doi.org/10.7717/peerj.201>
- Joensen, L., Borda, E., Kohout, T., Perry, S., García, G., & Sterin-Borda, L. (2003). Trypanosoma cruzi antigen that interacts with the  $\beta$ 1-adrenergic receptor and modifies myocardial contractile activity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *127*(2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00003-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00003-3)

- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(19), 9412–9420.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597417>
- Johnstone, R. M., Bianchini, A., & Teng, K. (1989). Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*, *74*(5), 1844–1851.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2790208>
- Jonker, C. T. H., Galmes, R., Veenendaal, T., Ten Brink, C., Van Der Welle, R. E. N., Liv, N., De Rooij, J., Peden, A. A., Van Der Sluijs, P., Margadant, C., & Klumperman, J. (2018). Vps3 and Vps8 control integrin trafficking from early to recycling endosomes and regulate integrin-dependent functions. *Nature Communications*, *9*(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03226-8>
- Junker, F., Gordon, J., & Qureshi, O. (2020). Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*, *11*.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01393>
- Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., & Nakamura, S. (2013). Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nature Communications*, *4*(1), 2712.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms3712>
- Kalinski, P. (2012). Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E 2. *The Journal of Immunology*, *188*(1), 21–28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of exosomes in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, *126*(4), 1208–1215.  
<https://doi.org/10.1172/JCI81135>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology , function , and biomedical applications of exosomes. *Science*, *367*(6478), 139–148. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus

- on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS17020170>
- Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Lee, J. J., & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 546(7659), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature22341>
- Kaneda, Y., Nagakura, K., & Goutsu, T. (1986). Lipid composition of three morphological stages of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 83(3), 533–536. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90292-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90292-0)
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science*, 313(5787), 670–673. <https://doi.org/10.1126/science.1129594>
- Kanninen, K. M., Bister, N., Koistinaho, J., & Malm, T. (2016). Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.020>
- Kaplanski, G. (2018). Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunological Reviews*, 281(1), 138–153. <https://doi.org/10.1111/imr.12616>
- Katakowski, M., Buller, B., Zheng, X., Lu, Y., Rogers, T., Osobamiro, O., Shu, W., Jiang, F., & Chopp, M. (2013). Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Letters*, 335(1), 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.019>
- Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A. G., & Truyens, C. (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(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>
- Kim, S. M., Yang, Y., Oh, S. J., Hong, Y., Seo, M., & Jang, M.

- (2017). Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *Journal of Controlled Release*, 266, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.013>
- Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.-K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T. R., Epple, M., Horn, P. A., Beelen, D. W., & Giebel, B. (2014). MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*, 28(4), 970–973. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.41>
- Krylova, S. V., & Feng, D. (2023). The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1337. <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>
- Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., & Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7312–7317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220998110>
- Kulkarni, M. M., Olson, C. L., Engman, D. M., & McGwire, B. S. (2009). Trypanosoma cruzi GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. *Infection and Immunity*, 77(5), 2193–2200. <https://doi.org/10.1128/IAI.01542-08>
- Kummer, D., Steinbacher, T., Schwietzer, M. F., Thölmann, S., & Ebnet, K. (2020). Tetraspanins: integrating cell surface receptors to functional microdomains in homeostasis and disease. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(4), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00673-3>
- Kuppeveld, F. J. van, Johansson, K. E., Galama, J. M., Kissing, J., Bölske, G., Logt, J. T. van der, & Melchers, W. J. (1994). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 149. [/pmc/articles/PMC201282/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7811100/)

- Kuz'min, E. V., & Zaitseva, G. N. (1986). Structure and function of kinetoplast DNA of Trypanosomatidae. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 51(6), 883–895. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3015262>
- Kwiatkowska, K., Matveichuk, O. V., Fronk, J., & Ciesielska, A. (2020). Flotillins: At the Intersection of Protein S-Palmitoylation and Lipid-Mediated Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2283. <https://doi.org/10.3390/ijms21072283>
- Kwon, S.-H., Oh, S., Nacke, M., Mostov, K. E., & Lipschutz, J. H. (2016). Adaptor Protein CD2AP and L-type Lectin LMAN2 Regulate Exosome Cargo Protein Trafficking through the Golgi Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 291(49), 25462–25475. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.729202>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lantos, A. B., Carlevaro, G., Araoz, B., Ruiz Diaz, P., Camara, M. de los M., Buscaglia, C. A., Bossi, M., Yu, H., Chen, X., Bertozzi, C. R., Mucci, J., & Campetella, O. (2016). Sialic Acid Glycobiology Unveils Trypanosoma cruzi Trypomastigote Membrane Physiology. *PLOS Pathogens*, 12(4), e1005559. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005559>
- Lee, J., Lee, H., Goh, U., Kim, J., Jeong, M., Lee, J., & Park, J.-H. (2016). Cellular Engineering with Membrane Fusogenic Liposomes to Produce Functionalized Extracellular Vesicles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(11), 6790–6795. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b01315>
- Lefèvre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olagnier, D., Authier, H., Duval, C., Dardenne, C., Bernad, J., Lemesre, J. L., Auwerx, J., Neyrolles, O., Pipy, B., & Coste, A. (2013). The C-type Lectin Receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 Contribute Both Positively and Negatively to the Macrophage Response to Leishmania infantum. *Immunity*, 38(5), 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.010>
- Levy, E. (2017). Exosomes in the Diseased Brain: First Insights

- from In vivo Studies. *Frontiers in Neuroscience*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00142>
- Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., & Andrews, N. W. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *Journal of Experimental Medicine*, 171(2), 401–413.  
<https://doi.org/10.1084/jem.171.2.401>
- Li, C., McManus, F. P., Plutoni, C., Pascariu, C. M., Nelson, T., Alberici Delsin, L. E., Emery, G., & Thibault, P. (2020). Quantitative SUMO proteomics identifies PIAS1 substrates involved in cell migration and motility. *Nature Communications*, 11(1), 834.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-14581-w>
- Li, D., Lou, Y., Zhang, Y., Liu, S., Li, J., & Tao, J. (2021). Sialylated immunoglobulin G: a promising diagnostic and therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Theranostics*, 11(11), 5430–5446. <https://doi.org/10.7150/thno.53961>
- Li, M., Zeringer, E., Barta, T., Schageman, J., Cheng, A., & Vlassov, A. V. (2014). Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652), 20130502.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0502>
- Li, M., Zhou, H., Yang, C., Wu, Y., Zhou, X., Liu, H., & Wang, Y. (2020). Bacterial outer membrane vesicles as a platform for biomedical applications: An update. *Journal of Controlled Release*, 323, 253–268.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.031>
- Li, T., DiLillo, D. J., Bournazos, S., Giddens, J. P., Ravetch, J. V., & Wang, L.-X. (2017). Modulating IgG effector function by Fc glycan engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(13), 3485–3490.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1702173114>
- Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A. T., Choi, J., Caradonna, K. L., Padmanabhan, P., Ndegwa, D. M., Temanni, M. R., Corrada Bravo, H., El-Sayed, N. M., & Burleigh, B. A. (2016). Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular

- Infection. *PLOS Pathogens*, 12(4), e1005511.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005511>
- Libisch, M. G., Rego, N., & Robello, C. (2021). Transcriptional Studies on *Trypanosoma cruzi* – Host Cell Interactions: A Complex Puzzle of Variables. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(June), 1–12.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.692134>
- Liempi, D., Zulantay, I., Varela, N. M., Canals, M., Guevara, A., Poulsen, N., & Apt, W. (2024). Parasite Burden of *Trypanosoma cruzi* in Whole Blood and Buffy Coat Determined by Real-Time PCR in Individuals with Chronic Chagas Disease. *Microorganisms*, 12(2), 249.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms12020249>
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P. A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J. C., Pinto, C. M., Serrano, M. G., Buck, G. A., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica*, 151, 166–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>
- Liu, S., Wu, X., Chandra, S., Lyon, C., Ning, B., jiang, L., Fan, J., & Hu, T. Y. (2022). Extracellular vesicles: Emerging tools as therapeutic agent carriers. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(10), 3822–3842.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.05.002>
- Longhi, S. A., García Casares, L. J., Muñoz-Calderón, A. A., Alonso-Padilla, J., & Schijman, A. G. (2023). Combination of ultra-rapid DNA purification (PURE) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in dried blood spots. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(4), e0011290.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011290>
- Lőrincz, P., Kenéz, L. A., Tóth, S., Kiss, V., Varga, Á., Csizmadia, T., Simon-Vecsei, Z., & Juhász, G. (2019). Vps8 overexpression inhibits HOPS-dependent trafficking routes by outcompeting Vps41/Lt. *ELife*, 8.  
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.45631>

- Lovo-Martins, M. I., Malvezi, A. D., Zanluqui, N. G., Lucchetti, B. F. C., Tatakahara, V. L. H., Mörking, P. A., Oliveira, A. G. de, Goldenberg, S., Wowk, P. F., & Pinge-Filho, P. (2018). Extracellular Vesicles Shed By Trypanosoma cruzi Potentiate Infection and Elicit Lipid Body Formation and PGE2 Production in Murine Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00896>
- Lozano, N., Samblas, M. G., Calabuig, E., Giménez Martí, M. J., Gómez Ruiz, M. D., Arce, J. M. S., Sequera-Arquelladas, S., Moreno, J. M. M., Trelis, M., & Osuna, A. (2023). Use of sera cell free DNA (cfDNA) and exovesicle-DNA for the molecular diagnosis of chronic Chagas disease. *PLOS ONE*, 18(9), e0282814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282814>
- Lübbbers, J., Rodríguez, E., & van Kooyk, Y. (2018). Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02807>
- Luquetti, A. O., Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Añez, N., Zingales, B., Ramgel-Aldao, R., Gonzalez, A., Levin, M. J., Umezawa, E. S., & Franco da Silveira, J. (2003). Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of Trypanosoma cruzi. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46(4), 265–271. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00051-8](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00051-8)
- Ma, S., Mangala, L. S., Hu, W., Bayaktar, E., Yokoi, A., Hu, W., Pradeep, S., Lee, S., Piehowski, P. D., Villar-Prados, A., Wu, S. Y., McGuire, M. H., Lara, O. D., Rodriguez-Aguayo, C., LaFargue, C. J., Jennings, N. B., Rodland, K. D., Liu, T., Kundra, V., ... Sood, A. K. (2021). CD63-mediated cloaking of VEGF in small extracellular vesicles contributes to anti-VEGF therapy resistance. *Cell Reports*, 36(7), 109549. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109549>
- Machado, F. S., Dutra, W. O., Esper, L., Gollob, K. J., Teixeira, M. M., Factor, S. M., Weiss, L. M., Nagajyothi, F., Tanowitz, H. B., & Garg, N. J. (2012). Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis



- of Chagas disease. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 34, Issue 6, pp. 753–770). Semin Immunopathol. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>
- Machado, F. S., Martins, G. A., Aliberti, J. C. S., Mestriner, F. L. A. C., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2000). Trypanosoma cruzi –Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide–Dependent Trypanocidal Activity. *Circulation*, *102*(24), 3003–3008. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.24.3003>
- Malkin, E. Z., & Bratman, S. V. (2020). Bioactive DNA from extracellular vesicles and particles. *Cell Death & Disease*, *11*(7), 584. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02803-4>
- Mantel, P.-Y., Hoang, A. N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A. R., Barteneva, N., & Marti, M. (2013). Malaria-Infected Erythrocyte-Derived Microvesicles Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System. *Cell Host & Microbe*, *13*(5), 521–534. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.009>
- Marcilla, A., Martin-Jaular, L., Trelis, M., de Menezes-Neto, A., Osuna, A., Bernal, D., Fernandez-Becerra, C., Almeida, I. C., & del Portillo, H. A. (2014). Extracellular vesicles in parasitic diseases. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 3, Issue 1). J Extracell Vesicles. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.25040>
- Marshall, S., Kelly, P. H., Singh, B. K., Pope, R. M., Kim, P., Zhanbolat, B., Wilson, M. E., & Yao, C. (2018). Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 355. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2937-y>
- Martin-Jaular, L., Nakayasu, E. S., Ferrer, M., Almeida, I. C., & del Portillo, H. A. (2011). Exosomes from Plasmodium yoelii-Infected Reticulocytes Protect Mice from Lethal Infections. *PLoS ONE*, *6*(10), e26588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026588>
- Martins, P., Machado, D., Theizen, T. H., Guarnieri, J. P. O., Bernardes, B. G., Gomide, G. P., Corat, M. A. F.,

- Abbehausen, C., Módena, J. L. P., Melo, C. F. O. R., Morishita, K. N., Catharino, R. R., Arns, C. W., & Lancellotti, M. (2018). Outer Membrane Vesicles from *Neisseria Meningitidis* (Proteosome) Used for Nanostructured Zika Virus Vaccine Production. *Scientific Reports*, *8*(1), 8290. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26508-z>
- Maruthi, M., Singh, D., Reddy, S. R., Mastan, B. S., Mishra, S., & Kumar, K. A. (2017). Modulation of host cell SUMOylation facilitates efficient development of *Plasmodium berghei* and *Toxoplasma gondii*. *Cellular Microbiology*, *19*(7), e12723. <https://doi.org/10.1111/cmi.12723>
- McGwire, B., & Chang, K.-P. (1994). Genetic rescue of surface metalloproteinase (gp63)-deficiency in *Leishmania amazonensis* variants increases their infection of macrophages at the early phase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *66*(2), 345–347. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90160-0)
- Melo, R. C. N. (2009). Acute heart inflammation: Ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(2), 279–294. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00388.x>
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnica-Worms, D., & Kalluri, R. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*, *523*(7559), 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature14581>
- Melo, S. A., Sugimoto, H., O'Connell, J. T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Qiu, L., Vitkin, E., Perelman, L. T., Melo, C. A., Lucci, A., Ivan, C., Calin, G. A., & Kalluri, R. (2014). Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*, *26*(5), 707–721. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.005>
- Mendivil-Alvarado, H., Limon-Miro, A. T., Carvajal-Millan, E., Lizardi-Mendoza, J., Mercado-Lara, A., Coronado-Alvarado, C. D., Rascón-Durán, M. L., Anduro-Corona, I., Talamás-Lara, D., Rascón-Careaga, A., & Astiazarán-García, H.

- (2023). Extracellular Vesicles and Their Zeta Potential as Future Markers Associated with Nutrition and Molecular Biomarkers in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6810. <https://doi.org/10.3390/ijms24076810>
- Mendt, M., Kamerkar, S., Sugimoto, H., McAndrews, K. M., Wu, C.-C., Gagea, M., Yang, S., Blanko, E. V. R., Peng, Q., Ma, X., Marszalek, J. R., Maitra, A., Yee, C., Rezvani, K., Shpall, E., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2018). Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. *JCI Insight*, 3(8). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99263>
- Menon, R., Debnath, C., Lai, A., Guanzon, D., Bhatnagar, S., Kshetrapal, P. K., Sheller-Miller, S., & Salomon, C. (2019). Circulating Exosomal miRNA Profile During Term and Preterm Birth Pregnancies: A Longitudinal Study. *Endocrinology*, 160(2), 249–275. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00836>
- Menon, R., Dixon, C. L., Sheller-Miller, S., Fortunato, S. J., Saade, G. R., Palma, C., Lai, A., Guanzon, D., & Salomon, C. (2019). Quantitative Proteomics by SWATH-MS of Maternal Plasma Exosomes Determine Pathways Associated With Term and Preterm Birth. *Endocrinology*, 160(3), 639–650. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00820>
- Messenger, L. A., Gilman, R. H., Verastegui, M., Galdos-Cardenas, G., Sanchez, G., Valencia, E., Sanchez, L., Malaga, E., Rendell, V. R., Jois, M., Shah, V., Santos, N., Abastoflor, M. del C., LaFuente, C., Colanzi, R., Bozo, R., & Bern, C. (2017). Toward Improving Early Diagnosis of Congenital Chagas Disease in an Endemic Setting. *Clinical Infectious Diseases*, 65(2), 268–275. <https://doi.org/10.1093/cid/cix277>
- Mezouar, S., Darbousset, R., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L., & Dubois, C. (2015). Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. *International Journal of Cancer*, 136(2), 462–475. <https://doi.org/10.1002/ijc.28997>
- Michael, A., Bajracharya, S., Yuen, P., Zhou, H., Star, R., Illei, G., & Alevizos, I. (2010). Exosomes from human saliva as a

- source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*, *16*(1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x>
- Midekessa, G., Godakumara, K., Ord, J., Viil, J., Lättekivi, F., Dissanayake, K., Kopanchuk, S., Rinken, A., Andronowska, A., Bhattacharjee, S., Rinken, T., & Fazeli, A. (2020). Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. *ACS Omega*, *5*(27), 16701–16710. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01582>
- Mimura, Y., Mimura-Kimura, Y., Saldova, R., Rudd, P. M., & Jefferis, R. (2022). Enhanced Immunomodulatory Effect of Intravenous Immunoglobulin by Fc Galactosylation and Nonfucosylation. *Frontiers in Immunology*, *13*(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.818382>
- Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimanoe, Y., Iwakura, Y., & Yoshida, H. (2010). IL-17 Is Necessary for Host Protection against Acute-Phase *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*, *185*(2), 1150–1157. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900047>
- Mohapatra, G., Gaur, P., Prabhakar, M., Singh, M., Rana, S., Singh, S., Kaur, N., Verma, S., Krishna, V., Singh, N., & Srikanth, C. V. (2018). A SUMOylation dependent switch of Rab7 governs intracellular life and pathogenesis of *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.222612>
- Moncayo, Á., & Silveira, A. C. (2009). Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(suppl 1), 17–30. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900005>
- Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Beer Stolz, D., Sullivan, M. L. G., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O. A., Divito, S. J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. C., & Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, *119*(3), 756–766. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338004>
- Moreno, M.-L., Escobar, J., Izquierdo-Álvarez, A., Gil, A., Pérez,

- S., Pereda, J., Zapico, I., Vento, M., Sabater, L., Marina, A., Martínez-Ruiz, A., & Sastre, J. (2014). Disulfide stress: a novel type of oxidative stress in acute pancreatitis. *Free Radical Biology and Medicine*, 70, 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.009>
- Mosca, W., & Cedillos, R. (1988). Autoantibodies and immunocomplexes in Chagas' disease. *Acta Científica Venezolana*, 39(4), 363–367. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3152044>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mott, A., Lenormand, G., Costales, J., Fredberg, J. J., & Burleigh, B. A. (2009). Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Cellular Physiology*, 218(2), 315. <https://doi.org/10.1002/JCP.21606>
- Mucci, J., Hidalgo, A., Mocetti, E., Argibay, P. F., Leguizamón, M. S., & Campetella, O. (2002). Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 3896–3901. <https://doi.org/10.1073/pnas.052496399>
- Mucci, J., Mocetti, E., Leguizamón, M. S., & Campetella, O. (2005). A Sexual Dimorphism in Intrathymic Sialylation Survey Is Revealed by the trans -Sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology*, 174(8), 4545–4550. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.8.4545>
- Mucci, J., Risso, M. G., Leguizamon, M. S., Frasch, A. C. C., & Campetella, O. (2006). The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by target cell sialylation. *Cellular Microbiology*, 8(7), 1086–1095. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00689.x>
- Muñoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A., & Herrmann, M. (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(5), 280–289.

<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.46>

Nandakumar, R., Tschisnarov, R., Meissner, F., Prabakaran, T., Krissanaprasit, A., Farahani, E., Zhang, B., Assil, S., Martin, A., Bertrams, W., Holm, C. K., Ablasser, A., Klause, T., Thomsen, M. K., Schmeck, B., Howard, K. A., Henry, T., Gothelf, K. V., Decker, T., & Paludan, S. R. (2019). Intracellular bacteria engage a STING–TBK1–MVB12b pathway to enable paracrine cGAS–STING signalling. *Nature Microbiology*, 4(4), 701–713.

<https://doi.org/10.1038/s41564-019-0367-z>

Nantakomol, D., Dondorp, A. M., Krudsood, S., Udomsangpetch, R., Pattanapanyasat, K., Combes, V., Grau, G. E., White, N. J., Viriyavejakul, P., Day, N. P. J., & Chotivanich, K. (2011). Circulating Red Cell–derived Microparticles in Human Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(5), 700–706. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq104>

Nardy, A. F. F. R., Freire-de-Lima, C. G., Pérez, A. R., & Morrot, A. (2016). Role of Trypanosoma cruzi Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 348.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00348>

Naseri, M., Bozorgmehr, M., Zöller, M., Ranaei Pirmardan, E., & Madjd, Z. (2020). Tumor-derived exosomes: the next generation of promising cell-free vaccines in cancer immunotherapy. *OncolImmunology*, 9(1).

<https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1779991>

Navarro, M., Navaza, B., Guionnet, A., & López-Vélez, R. (2012). Chagas Disease in Spain: Need for Further Public Health Measures. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1962. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001962>

Navarro, M., Reguero, L., Subirà, C., Blázquez-Pérez, A., & Requena-Méndez, A. (2022). Estimating chagas disease prevalence and number of underdiagnosed, and undertreated individuals in Spain. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 47, 102284.

<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102284>

Nde, P. N., Lima, M. F., Johnson, C. A., Pratap, S., & Villalta, F. (2012). Regulation and use of the extracellular matrix by

- Trypanosoma cruzi during early infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue NOV). Front Immunol. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00337>
- Nikfarjam, S., Rezaie, J., Kashanchi, F., & Jafari, R. (2020). Dexosomes as a cell-free vaccine for cancer immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 39(1), 258. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01781-x>
- Niu, M. C., & Twitty, V. C. (1953). The Differentiation of Gastrula Ectoderm in Medium Conditioned by Axial Mesoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 39(9), 985–989. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.9.985>
- Nogueira, P. M., Ribeiro, K., Silveira, A. C. O., Campos, J. H., Martins-Filho, O. A., Bela, S. R., Campos, M. A., Pessoa, N. L., Colli, W., Alves, M. J. M., Soares, R. P., & Torrecilhas, A. C. (2015). Vesicles from different *Trypanosoma cruzi* strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 28734. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>
- Nolte-'t Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., & 't Hoen, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, 40(18), 9272–9285. <https://doi.org/10.1093/nar/gks658>
- Norris, K. A., Bradt, B., Cooper, N. R., & So, M. (1991). Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 147(7), 2240–2247. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717552>
- Notomi, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), 63e – 63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Nouvellet, P., Dumonteil, E., & Gourbière, S. (2013). The Improbable Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Human: The Missing Link in the Dynamics and Control of Chagas

- Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(11), e2505. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002505>
- Noya, B. A. de, Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A., & Noya, O. (2015). Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 377–386. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140285>
- O'Neill, A. S. G., van den Berg, T. K., & Mullen, G. E. D. (2013). Sialoadhesin - a macrophage-restricted marker of immunoregulation and inflammation. *Immunology*, 138(3), 198–207. <https://doi.org/10.1111/imm.12042>
- Ofir-Birin, Y., Heidenreich, M., & Regev-Rudzki, N. (2017). Pathogen-derived extracellular vesicles coordinate social behaviour and host manipulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.03.004>
- Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., Gotoh, N., & Kuroda, M. (2013). Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Molecular Therapy*, 21(1), 185–191. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>
- Ohyama, K., Huy, N. T., Yoshimi, H., Kishikawa, N., Nishizawa, J. E., Roca, Y., Revollo Guzmán, R. J., Velarde, F. U. G., Kuroda, N., & Hirayama, K. (2016). Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas disease. *Parasite Immunology*, 38(10), 609–617. <https://doi.org/10.1111/pim.12341>
- Orrego, L. M., Romero, R., Osuna, A., & De Pablos, L. M. (2021). *Methods for the Isolation and Study of Exovesicle DNA from Trypanosomatid Parasites* (pp. 301–317). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1681-9_16)
- Orth, K., Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B., Mangel, W. F., Staskawicz, B., & Dixon, J. E. (2000). Disruption of Signaling by Yersinia Effector YopJ, a Ubiquitin-Like Protein Protease. *Science*, 290(5496), 1594–1597. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1594>



## Bibliografía

- Osuna, A., Adroher, F. J., & Lupiáñez, J. A. (1990). Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differentiation and Development*, 30(2), 89–95. [https://doi.org/10.1016/0922-3371\(90\)90077-A](https://doi.org/10.1016/0922-3371(90)90077-A)
- Osuna, A., Gamarro, F., Castanys, S., & Ruiz-Perez, L. M. (1986). Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. *International Journal for Parasitology*, 16(6), 629–632. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(86\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(86)90031-7)
- Osuna, A., Rodriguez-Cabezas, N., Boy, M., Castanys, S., & Gamarro, F. (1993). The invasion mechanism of the metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in nonphagocytic host cells. *Biological Research*, 26(1–2), 19–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7670531>
- Pacini, M. F., Balbi, C. B., Dinatale, B., González, F. B., Prochetto, E., De Hernández, M. A., Cribb, P., Farré, C., Espariz, M., Blancato, V. S., Magni, C., Marcipar, I., & Pérez, A. R. (2023). Intranasal trans-sialidase-based vaccine against *Trypanosoma cruzi* triggers a mixed cytokine profile in the nasopharynx-associated lymphoid tissue and confers local and systemic immunogenicity. *Acta Tropica*, 241, 106889. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106889>
- Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967–978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
- Pan, Z., Zhao, R., Li, B., Qi, Y., Qiu, W., Guo, Q., Zhang, S., Zhao, S., Xu, H., Li, M., Gao, Z., Fan, Y., Xu, J., Wang, H., Wang, S., Qiu, J., Wang, Q., Guo, X., Deng, L., ... Li, G. (2022). EWSR1-induced circNEIL3 promotes glioma progression and exosome-mediated macrophage immunosuppressive polarization via stabilizing IGF2BP3. *Molecular Cancer*, 21(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01485-6>
- Paranaíba, L. F., Guarneri, A. A., Torrecilhas, A. C., Melo, M. N., & Soares, R. P. (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), 1–5.  
<https://doi.org/10.1590/0074-02760190217>
- Parisse, P., Rago, I., Ulloa Severino, L., Perissinotto, F., Ambrosetti, E., Paoletti, P., Ricci, M., Beltrami, A. P., Cesselli, D., & Casalis, L. (2017). Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *European Biophysics Journal*, 46(8), 813–820. <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1252-4>
- Parton, R. G., McMahon, K.-A., & Wu, Y. (2020). Caveolae: Formation, dynamics, and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 65, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.02.001>
- Paulino, M., Iribarne, F., Dubin, M., Aguilera-Morales, S., Tapia, O., & Stoppani, A. O. M. (2005). The chemotherapy of chagas' disease: an overview. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(5), 499–519.  
<https://doi.org/10.2174/1389557053765565>
- Pecoul, B., Batista, C., Stobbaerts, E., Ribeiro, I., Vilasanjuan, R., Gascon, J., Pinazo, M. J., Moriana, S., Gold, S., Pereiro, A., Navarro, M., Torrico, F., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2016). The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0004343>
- Penas, F. N., Cevey, Á. C., Siffo, S., Mirkin, G. A., & Goren, N. B. (2016). Hepatic injury associated with Trypanosoma cruzi infection is attenuated by treatment with 15-deoxy- $\Delta$  12,14 prostaglandin J 2. *Experimental Parasitology*, 170, 100–108.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.015>
- Perets, N., Hertz, S., London, M., & Offen, D. (2018). Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice. *Molecular Autism*, 9(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0240-6>
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y., &

- Fisher, P. B. (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annual Review of Immunology*, 22, 929–979. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622>
- Petray, P., Bonardello, N., Clark, R., Agranatti, M., Corral, R., & Grinstein, S. (1992). Evaluation of an ELISA technique for detection of antigens and circulating immune complexes of *Trypanosoma cruzi* by a field study in an endemic zone of Argentina. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 34(2), 141–147. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1340028>
- Pfitzner, A.-K., Mercier, V., Jiang, X., Moser von Filseck, J., Baum, B., Šarić, A., & Roux, A. (2020). An ESCRT-III Polymerization Sequence Drives Membrane Deformation and Fission. *Cell*, 182(5), 1140-1155.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.021>
- Prescilla-Ledezma, A., Blandon, R., Schijman, A. G., Benatar, A., Saldaña, A., & Osuna, A. (2021). Correction: Mixed infections by different *Trypanosoma cruzi* discrete typing units among Chagas disease patients in an endemic community in Panama. *PLOS ONE*, 16(4), e0250184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250184>
- Previato, J., Andrade, A. F. B., Pessolani, M. C. V., & Mendonça-Previato, L. (1985). Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(1), 85–96. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90051-9)
- Qian, J., Tan, Y., Zhang, Y., Yang, Y., & Li, X. (2018). Prognostic value of glypican-1 for patients with advanced pancreatic cancer following regional intra-arterial chemotherapy. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8701>
- Qu, L., Ding, J., Chen, C., Wu, Z.-J., Liu, B., Gao, Y., Chen, W., Liu, F., Sun, W., Li, X.-F., Wang, X., Wang, Y., Xu, Z.-Y., Gao, L., Yang, Q., Xu, B., Li, Y.-M., Fang, Z.-Y., Xu, Z.-P., ... Wang, L.-H. (2016). Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell*, 29(5), 653–668. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.004>
- Quast, I., Keller, C. W., Maurer, M. A., Giddens, J. P.,

- Tackenberg, B., Wang, L.-X., Münz, C., Nimmerjahn, F., Dalakas, M. C., & Lünemann, J. D. (2015). Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(11), 4160–4170. <https://doi.org/10.1172/JCI82695>
- Queiroz, R. M. L., Ricart, C. A. O., Machado, M. O., Bastos, I. M. D., Santana, J. M. de, Sousa, M. V. de, Roepstorff, P., & Charneau, S. (2016). Insight into the Exoproteome of the Tissue-Derived Trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Chemistry*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00042>
- Quek, C., & Hill, A. F. (2017). The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *483*(4), 1178–1186. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.090>
- Rabas, N., Palmer, S., Mitchell, L., Ismail, S., Gohlke, A., Riley, J. S., Tait, S. W. G., Gammage, P., Soares, L. L., Macpherson, I. R., & Norman, J. C. (2021). PINK1 drives production of mtDNA-containing extracellular vesicles to promote invasiveness. *Journal of Cell Biology*, *220*(12). <https://doi.org/10.1083/jcb.202006049>
- Ramirez, M. I., Deolindo, P., de Messias-Reason, I. J., Arigi, E. A., Choi, H., Almeida, I. C., & Evans-Osses, I. (2017). Dynamic flux of microvesicles modulate parasite-host cell interaction of *Trypanosoma cruzi* in eukaryotic cells. *Cellular Microbiology*, *19*(4), e12672. <https://doi.org/10.1111/cmi.12672>
- Ramos-Benitez, M. J., Ruiz-Jimenez, C., Rosado-Franco, J. J., Ramos-Pérez, W. D., Mendez, L. B., Osuna, A., & Espino, A. M. (2018). Fh15 Blocks the Lipopolysaccharide-Induced Cytokine Storm While Modulating Peritoneal Macrophage Migration and CD38 Expression within Spleen Macrophages in a Mouse Model of Septic Shock. *MSphere*, *3*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00548-18>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>

- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi Jr, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2009). Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(suppl 1), 152–158. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900021>
- Rassi Jr, A., Rassi, S. G., & Rassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 76(1). <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2001000100008>
- Retana Moreira, L., Prescilla-Ledezma, A., Cornet-Gomez, A., Linares, F., Jódar-Reyes, A. B., Fernandez, J., Vannucci, A. K. I., De Pablos, L. M., & Osuna, A. (2021). Biophysical and biochemical comparison of extracellular vesicles produced by infective and non-infective stages of trypanosoma cruzi. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/ijms22105183>
- Retana Moreira, L., Rodríguez Serrano, F., & Osuna, A. (2019). Extracellular vesicles of Trypanosoma cruzi tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), e0007163. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>
- Ribeiro-Jr, G., Araújo, R. F. de, Carvalho, C. M. M. de, Cunha, G. M., Lanza, F. C., Miranda, D. L. P., Sousa, O. M. F. de, Santos, C. G. S. Dos, Fonseca, E. O. L., Santos, R. F. Dos, Reis, R. B., Gurgel-Gonçalves, R., & Reis, M. G. (2022). Triatomine fauna in the state of Bahia, Brazil: What changed after 40 years of the vector-control program? *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55, e07322021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0732-2021>
- Ribeiro, K. S., Vasconcellos, C. I., Soares, R. P., Mendes, M. T.,

- Ellis, C. C., Aguilera-Flores, M., de Almeida, I. C., Schenkman, S., Iwai, L. K., & Torrecilhas, A. C. (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). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1463779>
- Rivero, R., Bisio, M., Velázquez, E. B., Esteva, M. I., Scollo, K., González, N. L., Altcheh, J., & Ruiz, A. M. (2017). Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A potential novel tool for the detection of congenital Chagas infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(1), 26–28. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.012>
- Robinson, H., Ruelcke, J. E., Lewis, A., Bond, C. S., Fox, A. H., Bharti, V., Wani, S., Cloonan, N., Lai, A., Margolin, D., Li, L., Salomon, C., Richards, R. S., Farrell, A., Gardiner, R. A., Parton, R. G., Cristino, A. S., & Hill, M. M. (2021). Caveolin-1-driven membrane remodelling regulates hnRNPK-mediated exosomal microRNA sorting in cancer. *Clinical and Translational Medicine*, 11(4). <https://doi.org/10.1002/ctm2.381>
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*, 11(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- Rodrigues, E. S., Santos, G. Q., Silva, M. V. da, Barros, J. H. S., Bernardo, A. R., Diniz, R. L., Rubim, N. M., Roque, A. L. R., Jansen, A. M., Silva, E. D., & Xavier, S. C. C. (2022). Chagas Immunochromatographic Rapid Test in the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Wild and Domestic Canids. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.835383>
- Rook, G. A. W., Steele, J., Brealey, R., Whyte, A., Isenberg, D., Sumar, N., Nelson, J. L., Bodman, K. B., Young, A., Roitt, I. M., Williams, P., Scragg, I., Edge, C. J., Arkwright, P. D., Ashford, D., Wormald, M., Rudd, P., Redman, C. W. G., Dwek, R. A., & Rademacher, T. W. (1991). Changes in IgG

- glycoform levels are associated with remission of arthritis during pregnancy. *Journal of Autoimmunity*, 4(5), 779–794. [https://doi.org/10.1016/0896-8411\(91\)90173-A](https://doi.org/10.1016/0896-8411(91)90173-A)
- Ropert, C., & Gazzinelli, R. T. (2000). Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, 3(4), 395–403. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00111-9)
- Rosochowicz, M. A., Lach, M. S., Richter, M., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2023). Conditioned Medium – Is it an Undervalued Lab Waste with the Potential for Osteoarthritis Management? *Stem Cell Reviews and Reports*, 19(5), 1185–1213. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10517-1>
- Rubin-de-Celis, S. S. C., Uemura, H., Yoshida, N., & Schenkman, S. (2006). Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cellular Microbiology*, 8(12), 1888–1898. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00755.x>
- Salehi, M., & Sharifi, M. (2018). Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6370–6380. <https://doi.org/10.1002/jcp.26481>
- Salm, A., & Gertsch, J. (2019). Cultural perception of triatomine bugs and Chagas disease in Bolivia: a cross-sectional field study. *Parasites & Vectors*, 12(1), 291. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3546-0>
- Samuels, A. M., Clark, E. H., Galdos-Cardenas, G., Wiegand, R. E., Ferrufino, L., Menacho, S., Gil, J., Spicer, J., Budde, J., Levy, M. Z., Bozo, R. W., Gilman, R. H., & Bern, C. (2013). Epidemiology of and Impact of Insecticide Spraying on Chagas Disease in Communities in the Bolivian Chaco. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), e2358. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002358>
- San Francisco, J., Barría, I., Gutiérrez, B., Neira, I., Muñoz, C., Sagua, H., Araya, J. E., Andrade, J. C., Zailberger, A., Catalán, A., Remonsellez, F., Vega, J. L., & González, J. (2017). Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family

- protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. *Microbes and Infection*, 19(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.08.003>
- Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M., & Flavell, R. A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.04.008>
- Sanmarco, L. M., Ponce, N. E., Visconti, L. M., Eberhardt, N., Theumer, M. G., Minguez, Á. R., & Aoki, M. P. (2017). IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(4), 857–869. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006>
- Sansone, P., Savini, C., Kurelac, I., Chang, Q., Amato, L. B., Strillacci, A., Stepanova, A., Iommarini, L., Mastroleo, C., Daly, L., Galkin, A., Thakur, B. K., Soplop, N., Uryu, K., Hoshino, A., Norton, L., Bonafé, M., Cricca, M., Gasparre, G., ... Bromberg, J. (2017). Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43). <https://doi.org/10.1073/pnas.1704862114>
- Santavanond, J. P., Rutter, S. F., Atkin-Smith, G. K., & Poon, I. K. H. (2021). *Apoptotic Bodies: Mechanism of Formation, Isolation and Functional Relevance* (pp. 61–88). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67171-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67171-6_4)
- Santos, E. F., Silva, Â. A. O., Leony, L. M., Freitas, N. E. M., Daltro, R. T., Regis-Silva, C. G., Del-Rei, R. P., Souza, W. V., Ostermayer, A. L., Costa, V. M., Silva, R. A., Ramos, A. N., Sousa, A. S., Gomes, Y. M., & Santos, F. L. N. (2020). Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(8), e0008445. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008445>
- Santos, F. L. N., de Souza, W. V., Barros, M. da S., Nakazawa, M., Krieger, M. A., & Gomes, Y. de M. (2016). Chronic



- Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 1034–1039. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0820>
- Sanwlani, R., & Gangoda, L. (2021). Role of Extracellular Vesicles in Cell Death and Inflammation. *Cells*, 10(10), 2663. <https://doi.org/10.3390/cells10102663>
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
- Schaub, G. (1989). *Trypanosoma cruzi: Quantitative Studies of Development of Two Strains in Small Intestine and Rectum of the Vector Triatoma infestans*. 273, 260–273.
- Schenkman, S., Eichinger, D., Pereira, M. E. A., & Nussenzweig, V. (1994). Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 499–523. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002435>
- Schenkman, S., Ferguson, M. A. J., Heise, N., Cardoso de Almeida, M. L., Mortara, R. A., & Yoshida, N. (1993). Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59(2), 293–303. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90227-O](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90227-O)
- Schenkman, S., Pontes de Carvalho, L., & Nussenzweig, V. (1992). Trypanosoma cruzi trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *The Journal of Experimental Medicine*, 175(2), 567–575. <https://doi.org/10.1084/jem.175.2.567>
- Schijman, A. G., Alonso-Padilla, J., Longhi, S. A., & Picado, A. (2022). Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 117. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200444>
- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T.,

- Mejia Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hajar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velazquez, E., Tellez, T., Sanchez Leon, Z., Galvão, L., Nolder, D., ... Ladzins, J. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>
- Schitteck, B., & Sinnberg, T. (2014). Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Molecular Cancer*, *13*(1), 231. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-231>
- Schöneberg, J., Lee, I.-H., Iwasa, J. H., & Hurley, J. H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.121>
- Schorey, J. S., & Bhatnagar, S. (2008). Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic*, *9*(6), 871–881. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x>
- Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Reports*, *16*(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>
- Schwab, I., Mihai, S., Seeling, M., Kasperkiewicz, M., Ludwig, R. J., & Nimmerjahn, F. (2014). Broad requirement for terminal sialic acid residues and FcγRIIB for the preventive and therapeutic activity of intravenous immunoglobulins in vivo. *European Journal of Immunology*, *44*(5), 1444–1453. <https://doi.org/10.1002/eji.201344230>
- Schwab, I., & Nimmerjahn, F. (2013). Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature Reviews Immunology*, *13*(3), 176–189. <https://doi.org/10.1038/nri3401>
- Sepulveda, P., Hontebeyrie, M., Liegeard, P., Mascilli, A., & Norris, K. A. (2000). DNA-Based Immunization with *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein Elicits Complement Lytic Antibodies and Confers Protection against *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and*

- Immunity*, 68(9), 4986–4991.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4986-4991.2000>
- Sharma, A. I., Olson, C. L., Mamede, J. I., Gazos-Lopes, F., Epting, C. L., Almeida, I. C., & Engman, D. M. (2017). Sterol targeting drugs reveal life cycle stage-specific differences in trypanosome lipid rafts. *Scientific Reports*, 7(1), 9105.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08770-9>
- Sharma, S., Rasool, H. I., Palanisamy, V., Mathisen, C., Schmidt, M., Wong, D. T., & Gimzewski, J. K. (2010). Structural-Mechanical Characterization of Nanoparticle Exosomes in Human Saliva, Using Correlative AFM, FESEM, and Force Spectroscopy. *ACS Nano*, 4(4), 1921–1926. <https://doi.org/10.1021/nn901824n>
- Shehata, M. M., Mostafa, A., Teubner, L., Mahmoud, S. H., Kandeil, A., Elshesheny, R., Boubak, T. A., Frantz, R., Pietra, L. La, Pleschka, S., Osman, A., Kayali, G., Chakraborty, T., Ali, M. A., & Mraheil, M. A. (2019). Bacterial Outer Membrane Vesicles (OMVs)-Based Dual Vaccine for Influenza A H1N1 Virus and MERS-CoV. *Vaccines*, 7(2), 46.  
<https://doi.org/10.3390/vaccines7020046>
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., & Mann, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14440–14445.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14440>
- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral Transmission of Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M. A., McMaster, W. R., Foster, L. J., Levings, M. K., & Reiner, N. E. (2010). Leishmania Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses through Effects on Monocytes and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 185(9), 5011–5022.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000541>
- Silverman, J. M., & Reiner, N. E. (2012). Leishmania Exosomes

- Deliver Preemptive Strikes to Create an Environment Permissive for Early Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2011.00026>
- Singhal, J., Madan, E., Chaurasiya, A., Srivastava, P., Singh, N., Kaushik, S., Kahlon, A. K., Maurya, M. K., Marothia, M., Joshi, P., Ranganathan, A., & Singh, S. (2022). Host SUMOylation Pathway Negatively Regulates Protective Immune Responses and Promotes *Leishmania donovani* Survival. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.878136>
- Sinha, S., Hoshino, D., Hong, N. H., Kirkbride, K. C., Grega-Larson, N. E., Seiki, M., Tyska, M. J., & Weaver, A. M. (2016). Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *Journal of Cell Biology*, 214(2), 197–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601025>
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476.  
<https://doi.org/10.1038/ncb1800>
- Skotland, T., Hessvik, N. P., Sandvig, K., & Llorente, A. (2019). Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *Journal of Lipid Research*, 60(1), 9–18. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084343>
- Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, 30–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>
- Sloan, E., Tatham, M. H., Gros Lambert, M., Glass, M., Orr, A., Hay, R. T., & Everett, R. D. (2015). Analysis of the SUMO2 Proteome during HSV-1 Infection. *PLOS Pathogens*, 11(7), e1005059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005059>
- Smythies, L. E., & Smythies, J. R. (2014). Exosomes in the gut. *Frontiers in Immunology*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00104>

- Srikanthan, S., Li, W., Silverstein, R. L., & McIntyre, T. M. (2014). Exosome poly-ubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 12(11), 1906–1917. <https://doi.org/10.1111/jth.12712>
- Steed, H., & Sawyer, M. B. (2007). Pharmacology, pharmacokinetics and pharmacogenomics of paclitaxel. *Pharmacogenomics*, 8(7), 803–815. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.7.803>
- Stefanius, K., Servage, K., de Souza Santos, M., Gray, H. F., Toombs, J. E., Chimalapati, S., Kim, M. S., Malladi, V. S., Brekken, R., & Orth, K. (2019). Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.40226>
- Stijlemans, B., Caljon, G., Van Den Abbeele, J., Van Ginderachter, J. A., Magez, S., & De Trez, C. (2016). Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma brucei* within the Mammalian Host: Progression to Pathogenicity. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00233>
- Stoll, S., Jonuleit, H., Schmitt, E., Müller, G., Yamauchi, H., Kurimoto, M., Knop, J., & Enk, A. H. (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *European Journal of Immunology*, 28(10), 3231–3239. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3231::AID-IMMU3231>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3231::AID-IMMU3231>3.0.CO;2-Q)
- Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., & Schneider, A. (2010). Exosome Secretion Ameliorates Lysosomal Storage of Cholesterol in Niemann-Pick Type C Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26279–26288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134775>
- Sullivan, R., Saez, F., Girouard, J., & Frenette, G. (2005). Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.03.005>

- Sun, L., Li, D., Song, K., Wei, J., Yao, S., Li, Z., Su, X., Ju, X., Chao, L., Deng, X., Kong, B., & Li, L. (2017). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. *Scientific Reports*, *7*(1), 2552. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02786-x>
- Szempruch, A. J., Sykes, S. E., Kieft, R., Dennison, L., Becker, A. C., Gartrell, A., Martin, W. J., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., Hajduk, S. L., & Harrington, J. M. (2016). Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia. *Cell*, *164*(1–2), 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>
- Takahashi, A., Okada, R., Nagao, K., Kawamata, Y., Hanyu, A., Yoshimoto, S., Takasugi, M., Watanabe, S., Kanemaki, M. T., Obuse, C., & Hara, E. (2017). Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nature Communications*, *8*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms15287>
- Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H., & Ravetch, J. V. (1996). Augmented humoral and anaphylactic responses in FcγRII-deficient mice. *Nature*, *379*(6563), 346–349. <https://doi.org/10.1038/379346a0>
- Takenaka, E., Van Vo, A., Yamashita-Kanemaru, Y., Shibuya, A., & Shibuya, K. (2018). Selective DNAM-1 expression on small peritoneal macrophages contributes to CD4+ T cell costimulation. *Scientific Reports*, *8*(1), 15180. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33437-4>
- Tan, C., Wang, J., & Sun, B. (2021). Biopolymer-liposome hybrid systems for controlled delivery of bioactive compounds: Recent advances. *Biotechnology Advances*, *48*, 107727. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107727>
- Tarleton, R. L. (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Current Opinion in Immunology*, *19*(4), 430–434. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.06.003>
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of

- Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1749. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- Teixeira, M. M. (2003). Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Frontiers in Bioscience*, 8(5), 926. <https://doi.org/10.2741/926>
- Teixeira, P. C. (2012). Pathogenesis of Chagas disease cardiomyopathy. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2(3), 39. <https://doi.org/10.5495/wjcid.v2.i3.39>
- Thakur, B. K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., Costa-Silva, B., Zheng, Y., Hoshino, A., Brazier, H., Xiang, J., Williams, C., Rodriguez-Barrueco, R., Silva, J. M., Zhang, W., Hearn, S., Elemento, O., Paknejad, N., Manova-Todorova, K., Welte, K., ... Lyden, D. (2014). Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*, 24(6), 766–769. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.44>
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P., & Stroun, M. (2016). Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(3), 347–376. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9629-x>
- Thorpe, G. H. G., & Kricka, L. J. (1986). *Enhanced*

- chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase* (pp. 331–353). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)33078-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)33078-7)
- Todeschini, A. R., Dias, W. B., Girard, M. F., Wieruszeski, J.-M., Mendonça-Previato, L., & Previato, J. O. (2004). Enzymatically Inactive trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Binds Sialyl and  $\beta$ -Galactopyranosyl Residues in a Sequential Ordered Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5323–5328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310663200>
- Tonelli, R. R., Giordano, R. J., Barbu, E. M., Torrecilhas, A. C., Kobayashi, G. S., Langley, R. R., Arap, W., Pasqualini, R., Colli, W., & Alves, M. J. M. (2010). Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* Tissue Tropism: Preferential Binding of a Conserved Peptide Motif to the Vasculature In Vivo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e864. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000864>
- Tonelli, R. R., Torrecilhas, A. C., Jacysyn, J. F., Juliano, M. A., Colli, W., & Alves, M. J. M. (2011). In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: The conserved FLY domain of the gp85/trans-sialidase family potentiates host infection. *Parasitology*, 138(4), 481–492. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001411>
- Torralba, D., Baixauli, F., Villarroya-Beltri, C., Fernández-Delgado, I., Latorre-Pellicer, A., Acín-Pérez, R., Martín-Cófreces, N. B., Jaso-Tamame, Á. L., Iborra, S., Jorge, I., González-Aseguinolaza, G., Garaude, J., Vicente-Manzanares, M., Enríquez, J. A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2018). Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nature Communications*, 9(1), 2658. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05077-9>
- Torrecilhas, A. C., Soares, R. P., Schenkman, S., Fernández-Prada, C., & Olivier, M. (2020). Extracellular Vesicles in Trypanosomatids: Host Cell Communication. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(December), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.602502>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008).



- Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*, 319(5867), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Tribulatti, M. V., Mucci, J., Van Rooijen, N., Leguizamón, M. S., & Campetella, O. (2005). The trans -Sialidase from *Trypanosoma cruzi* Induces Thrombocytopenia during Acute Chagas' Disease by Reducing the Platelet Sialic Acid Contents. *Infection and Immunity*, 73(1), 201–207. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.201-207.2005>
- Trocoli Torrecilhas, A. C., Schumacher, R. I., Alves, M. J. M., & Colli, W. (2012). Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases. *Microbes and Infection*, 14(15), 1465–1474. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.008>
- Trocoli Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza, W., e Silva, N. C., de Almeida Abrahamsohn, I., Colli, W., & Manso Alves, M. J. (2009). *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, 11(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.10.003>
- Tsoi, K. M., MacParland, S. A., Ma, X.-Z., Spetzler, V. N., Echeverri, J., Ouyang, B., Fadel, S. M., Sykes, E. A., Goldaracena, N., Kathis, J. M., Conneely, J. B., Alman, B. A., Selzner, M., Ostrowski, M. A., Adeyi, O. A., Zilman, A., McGilvray, I. D., & Chan, W. C. W. (2016). Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver. *Nature Materials*, 15(11), 1212–1221. <https://doi.org/10.1038/nmat4718>
- Tsuchimoto, Y., Asai, A., Tsuda, Y., Ito, I., Nishiguchi, T., Garcia, M. C., Suzuki, S., Kobayashi, M., Higuchi, K., & Suzuki, F. (2015). M2b Monocytes Provoke Bacterial Pneumonia and Gut Bacteria-Associated Sepsis in Alcoholics. *The Journal of Immunology*, 195(11), 5169–5177. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501369>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)

- Udompornpitak, K., Bhunyakarnjanarat, T., Charoensappakit, A., Dang, C. P., Saisorn, W., & Leelahavanichkul, A. (2021). Lipopolysaccharide-Enhanced Responses against Aryl Hydrocarbon Receptor in FcγRIIb-Deficient Macrophages, a Profound Impact of an Environmental Toxin on a Lupus-Like Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4199. <https://doi.org/10.3390/ijms22084199>
- Urban, I., Boiani Santurio, L., Chidichimo, A., Yu, H., Chen, X., Mucci, J., Agüero, F., & Buscaglia, C. A. (2011). Molecular diversity of the Trypanosoma cruzi TcSMUG family of mucin genes and proteins. *Biochemical Journal*, 438(2), 303–313. <https://doi.org/10.1042/BJ20110683>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- van de Geijn, F. E., Wuhrer, M., Selman, M. H., Willemsen, S. P., de Man, Y. A., Deelder, A. M., Hazes, J. M., & Dolhain, R. J. (2009). Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Research & Therapy*, 11(6), R193. <https://doi.org/10.1186/ar2892>
- van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 676–705. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. (2011). The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell*, 21(4), 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- Vattepu, R., Sneed, S. L., & Anthony, R. M. (2022). Sialylation as an Important Regulator of Antibody Function. *Frontiers in Immunology*, 13(April), 1–15.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.818736>

- Vázquez, K., Paulino, M., Salas, C. O., Zarate-Ramos, J. J., Vera, B., & Rivera, G. (2017). Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti- Trypanosoma cruzi Drugs. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(11), 939–946. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170315145410>
- Verma, S., Mohapatra, G., Ahmad, S. M., Rana, S., Jain, S., Khalsa, J. K., & Srikanth, C. V. (2015). Salmonella Engages Host MicroRNAs To Modulate SUMOylation: a New Arsenal for Intracellular Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 35(17), 2932–2946. <https://doi.org/10.1128/MCB.00397-15>
- Vincent-Schneider, H. (2002). Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *International Immunology*, 14(7), 713–722. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxf048>
- Wang, H., Zhang, M., Bianchi, M., Sherry, B., Sama, A., & Tracey, K. J. (1998). Fetuin ( $\alpha 2$  -HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage deactivating molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(24), 14429–14434. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14429>
- Wang, J., Deng, Z., Wang, Z., Wu, J., Gu, T., Jiang, Y., & Li, G. (2016). MicroRNA-155 in exosomes secreted from helicobacter pylori infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *American Journal of Translational Research*, 8(9), 3700–3709. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27725852>
- Wang, J., Sun, X., Zhao, J., Yang, Y., Cai, X., Xu, J., & Cao, P. (2017). Exosomes: A Novel Strategy for Treatment and Prevention of Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00300>
- Wang, L., Zhang, S., Wu, H., Rong, X., & Guo, J. (2019). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(2), 345–358. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>
- Wang, P., Wang, H., Huang, Q., Peng, C., Yao, L., Chen, H., Qiu, Z., Wu, Y., Wang, L., & Chen, W. (2019). Exosomes from M1-Polarized Macrophages Enhance Paclitaxel

- Antitumor Activity by Activating Macrophages-Mediated Inflammation. *Theranostics*, 9(6), 1714–1727.  
<https://doi.org/10.7150/thno.30716>
- Ward, A. I., Olmo, F., Atherton, R. L., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2020). Trypanosoma cruzi amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate. *Open Biology*, 10(12).  
<https://doi.org/10.1098/rsob.200261>
- Watkins, H. C., Rappazzo, C. G., Higgins, J. S., Sun, X., Brock, N., Chau, A., Misra, A., Cannizzo, J. P. B., King, M. R., Maines, T. R., Leifer, C. A., Whittaker, G. R., DeLisa, M. P., & Putnam, D. (2017). Safe Recombinant Outer Membrane Vesicles that Display M2e Elicit Heterologous Influenza Protection. *Molecular Therapy*, 25(4), 989–1002.  
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.01.010>
- Wawrocki, S., Druszczynska, M., Kowalewicz-Kulbat, M., & Rudnicka, W. (2016). Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. *Acta Biochimica Polonica*, 63(1).  
[https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1153](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1153)
- Webber, J., Steadman, R., Mason, M. D., Tabi, Z., & Clayton, A. (2010). Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer Research*, 70(23), 9621–9630. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1722>
- Whitehead, B., Wu, L., Hvam, M. L., Aslan, H., Dong, M., Dyrskjøt, L., Ostenfeld, M. S., Moghimi, S. M., & Howard, K. A. (2015). Tumour exosomes display differential mechanical and complement activation properties dependent on malignant state: implications in endothelial leakiness. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1).  
<https://doi.org/10.3402/jev.v4.29685>
- WHO. (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.
- WHO. (2021). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*.

- WHO. (2022). *Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease, W. H. O. (2002). *Control of Chagas disease : second report of the WHO expert committee*.
- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, *175*(1), 231–237. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90383-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90383-1)
- Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., & Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(13), 5022–5027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
- Williams, J. T., Mubiru, J. N., Schlabritz-Loutsevitch, N. E., Rubicz, R. C., VandeBerg, J. L., Dick, E. J., & Hubbard, G. B. (2009). Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in *Macaca fascicularis* using archived tissues. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *81*(2), 228–234.
- Wise, J. (2021). Covid-19: Delta variant doubles risk of hospital admission compared with alpha variant, study shows. *BMJ*, *n2152*. <https://doi.org/10.1136/bmj.n2152>
- Witwer, K. W., Goberdhan, D. C. I., O’Driscoll, L., Théry, C., Welsh, J. A., Blenkiron, C., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J. M., Fu, Q. L., Hill, A. F., Lenassi, M., Lötvall, J., Nieuwland, R., Ochiya, T., Rome, S., Sahoo, S., & Zheng, L. (2021). Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(14). <https://doi.org/10.1002/jev2.12182>
- Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology*, *13*(3), 269–288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>

- Wong, K., Ren, X.-R., Huang, Y.-Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S. M., Mei, L., Wu, J. Y., Xiong, W.-C., & Rao, Y. (2001). Signal Transduction in Neuronal Migration. *Cell*, *107*(2), 209–221. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00530-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00530-X)
- Woo, J., Sharma, S., & Gimzewski, J. (2016). The Role of Isolation Methods on a Nanoscale Surface Structure and its Effect on the Size of Exosomes. *Journal of Circulating Biomarkers*, *5*, 11. <https://doi.org/10.5772/64148>
- Wozniak, A. L., Adams, A., King, K. E., Dunn, W., Christenson, L. K., Hung, W.-T., & Weinman, S. A. (2020). The RNA binding protein FMR1 controls selective exosomal miRNA cargo loading during inflammation. *Journal of Cell Biology*, *219*(10). <https://doi.org/10.1083/jcb.201912074>
- Wyllie, M. P., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathogens and Disease*, *75*(7). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx077>
- Xu, H., Toyota, N., Xing, Y., Fujita, Y., Huang, Z., Touma, M., Wu, Q., & Sugimoto, K. (2014). Enhancement of phagocytosis and cytotoxicity in macrophages by tumor-derived IL-18 stimulation. *BMB Reports*, *47*(5), 286–291. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.5.152>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. -M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1). <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang, E., Wang, X., Gong, Z., Yu, M., Wu, H., & Zhang, D. (2020). Exosome-mediated metabolic reprogramming: the emerging role in tumor microenvironment remodeling and its influence on cancer progression. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 242.

<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00359-5>

- Yang, T., Martin, P., Fogarty, B., Brown, A., Schurman, K., Phipps, R., Yin, V. P., Lockman, P., & Bai, S. (2015). Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharmaceutical Research*, 32(6), 2003–2014. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1593-y>
- Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L., & Matthews, K. R. (2000). Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes from Escherichia coli O157:H7 to Other Enteric Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4414–4420. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000>
- Yasuda, K., Nakanishi, K., & Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 649. <https://doi.org/10.3390/ijms20030649>
- Yeo, R. W. Y., Lai, R. C., Zhang, B., Tan, S. S., Yin, Y., Teh, B. J., & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell: An efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.001>
- Yim, N., Ryu, S.-W., Choi, K., Lee, K. R., Lee, S., Choi, H., Kim, J., Shaker, M. R., Sun, W., Park, J.-H., Kim, D., Heo, W. Do, & Choi, C. (2016). Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein–protein interaction module. *Nature Communications*, 7(1), 12277. <https://doi.org/10.1038/ncomms12277>
- Yin, W., Ouyang, S., Li, Y., Xiao, B., & Yang, H. (2013). Immature dendritic cell-derived exosomes: a promise subcellular vaccine for autoimmunity. *Inflammation*, 36(1), 232–240. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9539-1>
- Yoshida, N. (2009). Molecular mechanisms of Trypanosoma cruzi infection by oral route. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(suppl 1), 101–107. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900015>
- Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M.,

- Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2014). Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nature Communications*, 5(1), 3591. <https://doi.org/10.1038/ncomms4591>
- Yuyama, K., Sun, H., Usuki, S., Sakai, S., Hanamatsu, H., Mioka, T., Kimura, N., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y., & Igarashi, Y. (2015). A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- $\beta$  peptide. *FEBS Letters*, 589(1), 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.027>
- Zhang, W., Jiang, X., Bao, J., Wang, Y., Liu, H., & Tang, L. (2018). Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00090>
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P. (2020). Exosome: A review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 6917–6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>
- Zhang, Y., Hu, Y.-W., Zheng, L., & Wang, Q. (2017). Characteristics and Roles of Exosomes in Cardiovascular Disease. *DNA and Cell Biology*, 36(3), 202–211. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3496>
- Zhao, H., Zhang, X., Frazão, J. B., Condino-Neto, A., & Newburger, P. E. (2013). HOX antisense lincRNA HOXA-AS2 is an apoptosis repressor in all trans retinoic acid treated NB4 promyelocytic leukemia cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(10), 2375. <https://doi.org/10.1002/JCB.24586>
- Zhao, X., Dai, J., Xiao, X., Wu, L., Zeng, J., Sheng, J., Su, J., Chen, X., Wang, G., & Li, K. (2014). PI3K/Akt Signaling Pathway Modulates Influenza Virus Induced Mouse Alveolar Macrophage Polarization to M1/M2b. *PLoS ONE*, 9(8), e104506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104506>
- Zhao, Y. G., Codogno, P., & Zhang, H. (2021). Machinery, regulation and pathophysiological implications of



- autophagosome maturation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(11), 733–750. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00392-4>
- Zhao, Z., Zhong, L., Li, P., He, K., Qiu, C., Zhao, L., & Gong, J. (2020). Cholesterol impairs hepatocyte lysosomal function causing M1 polarization of macrophages via exosomal miR-122-5p. *Experimental Cell Research*, 387(1), 111738. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111738>
- Zhou, W., Fong, M. Y., Min, Y., Somlo, G., Liu, L., Palomares, M. R., Yu, Y., Chow, A., O'Connor, S. T. F., Chin, A. R., Yen, Y., Wang, Y., Marcusson, E. G., Chu, P., Wu, J., Wu, X., Li, A. X., Li, Z., Gao, H., ... Wang, S. E. (2014). Cancer-Secreted miR-105 Destroys Vascular Endothelial Barriers to Promote Metastasis. *Cancer Cell*, 25(4), 501–515. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.03.007>
- Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., Sturm, N., Tibayrenc, M., & Schijman, A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nature Medicine*, 4(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>
- Zubair, K., You, C., Kwon, G., & Kang, K. (2021). Two Faces of Macrophages: Training and Tolerance. *Biomedicines*, 9(11),

1596. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111596>

Zulantay, I., Apt, W., Gil, L. C., Rocha, C., Mundaca, K., Solari, A., Sánchez, G., Rodríguez, C., Martínez, G., De Pablos, L. M., Sandoval, L., Rodríguez, J., Vilchez, S., & Osuna, A. (2007). The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *101*(8), 673–679. <https://doi.org/10.1179/136485907X241415>