



REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE LA REGIÓN DE MURCIA

SESIÓN EXTRAORDINARIA Y SOLEMNE DE RECEPCIÓN COMO ACADÉMICO CORRESPONDIENTE

DISCURSO DE INGRESO

PARÁSITO-CÉLULA; EL SUTIL Y ENGAÑOSO SUSURRO QUE MANTIENE EL PARÁSITO

TRYpanosoma CRUZI

POR

Dr. Don Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

A decorative horizontal border consisting of a repeating pattern of red diamond shapes.

DISCURSO DE PRESENTACIÓN

POR EL

Excmo. Sr. D. Eduardo Osuna Carrillo de Albornoz

27 de noviembre de 2025

MURCJA



I^DE^E
INSTITVTO
D ESPAÑA

DISCURSOS

LEÍDOS EN LA SESIÓN EXTRAORDINARIA Y SOLEMNE
DE RECEPCIÓN COMO ACADÉMICO CORRESPONDIENTE,
CELEBRADA POR LA

REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA
DE LA REGIÓN DE MURCIA

27 de noviembre de 2025

Discurso de ingreso

por

Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz
**‘Parásito-Célula; el sutil y engañoso susurro
que mantiene el parásito
Trypanosoma cruzi’**

Discurso de presentación

por el

Excmo. Sr. D. Eduardo Osuna Carrillo de Albornoz
Académico de Número. Real Academia de Medicina y Cirugía
de la Región de Murcia

Edita:



*Real Academia de Medicina y Cirugía
de la Región de Murcia*

Realización y producción:

Nextcolor

Depósito Legal:

MU 1945-2025

Índice

• Discurso de presentación.....	7
• Discurso de ingreso: <i>Parásito-Célula; el sutil y engañoso susurro que mantiene el parásito</i> Trypanosoma cruzi	17

Discurso de presentación

por el

Excmo. Sr. D. Eduardo Osuna Carrillo de Albornoz
Académico de Número de la Real Academia de Medicina y Cirugía
de la Región de Murcia

*Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Medicina y Cirugía de la Región de Murcia,
Excmos. e Ilmos. Señores Académicos,
Excmas. e Ilmas. Autoridades,
Amigos y compañeros,
Señoras y señores.*

Me invade una gran satisfacción por haber sido elegido para desempeñar el noble deber de presentar y dar, por tanto, la bienvenida como Académico Correspondiente de esta Ilustre Corporación al Profesor Antonio Osuna Carrillo de Albornoz, Catedrático Emérito de Parasitología de la Universidad de Granada.

Por esta razón transmito mi agradecimiento a los miembros de esta Corporación, que me han confiado realizar este honroso encargo y me brindan la oportunidad de transmitirles, a través de esta laudatio, mi sentimiento de afecto y admiración por el recipiendario que hoy ingresa para acompañarnos en las tareas académicas.

Aparte de gratitud por el honor que se me concede, me asalta un sentimiento de preocupación y de pudor, al ser mi hermano, el primogénito, quien ingresa en esta corporación y no poder ser totalmente objetivo en mi misión. Al respecto, he de confesar que cuando el Profesor Segovia, presidente de esta institución me comentó en privado su deseo de que el Profesor Osuna perteneciera a esta academia, lo primero que hice fue agradecer su intención, para a continuación decirle que la propuesta no partiría de mí, sino de una gran com-

pañera de academia, D^a María de los Angeles Rodríguez González. No porque yo no reconozca sus méritos, sino por mantener una posición neutral y dotar al procedimiento de la máxima integridad e imparcialidad.

Las Academias fueron fundadas en el Siglo XVIII, en el espíritu de la Ilustración, en momentos de crisis y de involución, como ejemplos de renovación y de la crítica constructiva. La Institución que hoy nos acoge, con más de dos siglos de existencia, creada en 1811 en plena Guerra de Independencia y en medio de una terrible epidemia de fiebre amarilla, ha sido un paradigma en la lucha contra las enfermedades epidémicas que desde su creación han asolado la ciudad y la Región. En la actualidad, como en sus orígenes, es uno de los principales focos de talento y creatividad, que demuestra día a día que el conocimiento y el saber no se consiguen sin esfuerzo. La independencia de criterio de sus miembros, la libertad de obrar y de pensar, el compromiso y la ejemplaridad de sus integrantes hacen de nuestra institución, como del resto de las academias científicas y culturales, unos referentes para la sociedad actual, inmersas en la realidad en la que viven y se desarrollan.

Pocos sucesos pueden contentar más a un profesor universitario que un acto como el que hoy celebramos, tender la mano a otro compañero ante el ingreso en la corporación que nos convoca. Comprendan que cuando se trata de una relación fraternal, en el literal sentido de la palabra, la satisfacción es infinita.

En la vida de una persona es muy importante, y privativo de muy pocas, ser elegido miembro de una Academia científica. Este es el momento que hoy vive el Prof. Osuna. Su presencia en este acto como protagonista no ha sido fruto de la casualidad, sino de una larga y feliz historia que, por motivos de tiempo, procedo a resumir.

Octavio Paz, en su estudio sobre el poeta portugués Fernando Pessoa escribió que “los poetas no tienen biografía. Su obra es su biografía”. Pues bien, parafraseando estas palabras “los científicos no tienen biografía, es su obra su propia biografía”. Antonio, nuestro nuevo académico, es la biografía de un hombre de ciencia, pero sus cualidades le han acompañado más allá de la investigación y sus aficiones llenan también de contenido su existencia. El Profesor Osuna nació junto a los Jardines del Triunfo en Granada. Es el mayor de tres hermanos, él parasitólogo, Ignacio bioquímico y quien les habla, especialista en Medicina Legal y Forense. Los tres somos hombres de ciencia, aunque

de especialidades muy diferentes, pero que en algún momento nos hemos encontrado. Por ejemplo, en la búsqueda de una causa etiológica infecciosa a la muerte súbita cardiaca o una causa parasitaria cerebral en la génesis de respuestas exacerbadas a determinadas estímulos que se reflejen en conductas inadaptadas, en las que la bioquímica cerebral, conocida como neuroquímica puede también estar presente.

A nuestros padres les debe, les debemos, la formación como persona, forjando nuestra su vida y nuestro carácter. La influencia de nuestro abuelo José, farmacéutico titular de Almuñécar, por aquel entonces encargado de preparar fórmulas magistrales y amante de la química, y sin duda, el influjo de nuestro padre, Antonio, médico especialista de digestivo fueron responsables de nuestra inclinación hacia disciplinas científicas. Todo ello, con la mirada siempre atenta y la compañía silenciosa, pero constante y abnegada de nuestra madre Carolina. Es curioso, pero ninguno nos dedicamos a la Farmacia ni a la Medicina clínica, pero nunca fue objeto de reproche alguno, sino todo lo contrario: estímulo y apoyo para conseguir nuestras aspiraciones.

Antonio estudió en el colegio de los Escolapios de Granada. Como a muchos de los niños de entonces, le maravillaban los animales y la ciencia. Le encantaba la naturaleza y rara era la vez que no traía después de las múltiples excursiones que hacía con el colegio o con los amigos, algún insecto, anfibio o reptil a casa. La paciencia de nuestra madre fue inmensa. Más de una vez estos animales se escaparon por la vivienda, e incluso en alguna ocasión a las de los vecinos escuchándose los consiguientes gritos. Nuestro abuelo le regaló un pequeño microscopio con el que se acercaba a escudriñar la vida celular.

En vacaciones, Antonio pasaba largas temporadas en Almuñécar junto a sus abuelos donde se perdía en la rebotica de la Farmacia y también surcaba el mar con una pequeña barca y buceaba en las incomparables calas. Ahora estos parajes son su permanente refugio de reflexión y descanso.

Fruto de su primer matrimonio con María del Carmen Mascaró, también catedrática de Parasitología, son sus tres hijos Antonio, Fernando y Carolina, quienes junto a su actual esposa María Teresa Galán, también parasitóloga de la Universidad de Valencia, le acompañan y le ofrecen acertado y constante consejo.

El currículum investigador del profesor Osuna es de una gran brillantez. Discúlpennme, que lo sintetice para ajustarme al tiempo encomendado.

Antonio Osuna es licenciado en Biología, de la segunda promoción de la Facultad de Ciencias, sección Biológicas de la Universidad de Granada. Entró como alumno interno en el Departamento de Parasitología, situado en la Facultad de Farmacia en un edificio contiguo al Instituto López-Neyra, llamado así en honor a su fundador Don Carlos Rodríguez López-Neyra y de Gorgot, quien, con 26 años, en 1911, ganó por oposición la cátedra de Granada. El Profesor López Neyra era un gran hombre, como persona y como científico, el más citado, después de Cajal, en la primera mitad del siglo pasado. Su discípulo y continuador fue D. Diego Guevara Pozo, iniciador de la parasitología experimental. Su mejor discípulo y continuador, entre otros el primero en notoriedad, fue Antonio Osuna a quien hoy tenemos el placer de presentar. El y la Profesora Mascaró fueron los catedráticos de la tercera generación nacida de aquel Instituto.

Antonio Osuna fue becario predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia en el CSIC y posteriormente becario durante dos años en el Imperial College de Londres donde estuvo bajo la tutoría del Profesor Smyth, fisiólogo y bioquímico especializado en helmintos, especialmente en *Echinococcus*.

Defendió la tesis doctoral en 1978 bajo la dirección del Profesor Guevara Pozo, sobre un tema novedoso por aquel entonces, el cultivo in vitro de helmintos parásitos obteniendo la máxima calificación y el premio extraordinario del doctorado. Comenzó como colaborador en la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Farmacia en 1972, para posteriormente ganar las plazas de Adjunto en 1980 y Catedrático de Parasitología en 1987.

Dijo Platón “sin esfuerzo no se puede prosperar. Aunque la tierra sea buena, no se puede tener una cosecha abundante sin cultivarla”. El éxito enseña lo que es el trabajo duro, la constancia que se esconde detrás del esfuerzo de cada día y que nada es fruto de la suerte o de la casualidad. Nos muestra los aciertos que hemos tenido en nuestro camino y que no debemos olvidar. Al respecto, Antonio es perseverante y constante y estas cualidades le han ayudado para superar las adversidades.

Desde el primer minuto, Antonio Osuna destacó por su amor a la investigación, su diligente dedicación y su gran sentido de la responsabilidad, así

como por su carácter afable y caballerosidad en el trato con sus superiores, compañeros y alumnos. Son cualidades que le caracterizan y atesora. En toda su trayectoria tuvo el acertado consejo de D. Federico Mayor Zaragoza.

El Profesor Osuna es una persona sencilla. Se considera con suerte y atribuye sus méritos a quienes le han formado y le han acompañado en su vida. Nuestro nuevo Académico es “andariego”, ha recorrido el planeta, y sigue haciéndolo, buscando nuevas técnicas, buscando contactos científicos o transmitiendo su conocimiento.

Ha desarrollado su actividad investigadora en el estudio de los aspectos bioquímicos y moleculares de los parásitos, canalizando sus líneas de investigación entre la Parasitología y la Inmunología. Ha participado en 66 proyectos de financiación pública (nacionales, regionales, de la UE y del National of Health Institute de Estados Unidos) y ha estado vinculado a compañías farmacéuticas en muchos de ellos (14 contratos). Es autor de numerosas actividades de transferencia de investigación. Posee 19 patentes nacionales e internacionales, 9 de ellas licenciadas. Ha trabajado en centros de investigación del Reino Unido, Francia, Bélgica y Argentina. Ha colaborado con organizaciones supranacionales como la UNESCO y la ONU. Es académico correspondiente de la Academia Nacional de Farmacia. Evaluador de Comités Evaluadores Nacionales e Internacionales.

Fue Director de la OTRI (Oficina de Transferencia de Resultados Investigación) de la Universidad de Granada 1988-1992; promotor y Director del Instituto Universitario de Investigación Biotecnológica de Granada; promotor del Programa de Doctorado de Calidad en Biotecnología que dio paso al Máster en Biotecnología y al Grado en Biotecnología de la Universidad de Granada.

Ha sido Coordinador de la Cátedra UNESCO de Medicina tropical de la Universidad de Granada (1991-1999), organizador de la Cátedra UNESCO de Medicina Tropical en Maputo (Mozambique) y presidente de la Sociedad Española de Parasitología, desde 2011 a 2015.

Ha publicado un total de 247 trabajos científicos la mayoría de ellos en las revistas de más elevado impacto con un total de 7203 citas y un índice h de 45, lo que significa que cuenta con 45 publicaciones de las que al menos 45 autores que hicieron otros trabajos científicos en otros lugares del mundo, le citan en

apoyo o interpretación de sus resultados. Su trabajo más citado con 297 citas es *Extracellular vesicles in parasitic diseases* publicado en *Journal of extracellular vesicles*. Cuenta con seis sexenios de investigación.

Maestro es quien traspasa sus propios dominios del saber y enseña con honestidad, con responsabilidad y con honradez con un estricto respeto por la ética y el aprecio de la verdad. El Profesor Osuna Ha dirigido 42 tesis doctorales y reconoce que su mayor satisfacción es haber podido formar muchos científicos en España y en el extranjero, siendo su mayor deseo que la ciencia en España sea reconocida por la sociedad y las instituciones.

Señor Presidente, Señoras y señores.

En el discurso de recepción pública del Profesor Segovia, Presidente de esta Institución, como académico electo el 25 de marzo de 2004 titulado “Las enfermedades parasitarias: ¿enfermedades tropicales o enfermedades de los pobres?” señalaba que nuestro conocimiento de las enfermedades parasitarias no es separable de nuestro conocimiento de la raza humana; ambos han caminado de la mano a lo largo de la evolución. Los parásitos ya estaban con nosotros cuando en las áreas tropicales surgieron los primeros homínidos. Afectan con más gravedad a los países más pobres del mundo, sin embargo, como consecuencia de la tendencia a la globalización, los movimientos migratorios y los viajes a países tropicales los profesionales sanitarios se enfrentan cada vez con mayor frecuencia a estas enfermedades en cualquier lugar del planeta. La OMS calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas que padecen la enfermedad de Chagas y unas 100.000 en Europa, de las que entre 50 y 70 mil podrían encontrarse en España, país de destino y paso regular para migrantes provenientes de América Latina.

La Región de Murcia fue elegida por la OMS como modelo para el resto de las regiones de todo el mundo para erradicar la enfermedad de Chagas, gracias a la labor del Profesor Segovia y de su equipo que demostró que el tratamiento de la enfermedad en la mujer en edad fértil evita la transmisión a su futuro hijo, por lo que desde 2017 no ha nacido ningún bebé con esta patología. Además, también ha sido la primera región mundial en incorporar el cribado universal que incluye la prueba de Chagas a todas las mujeres embarazadas,

con lo que se detecta todo posible caso de recién nacido infectado por esta enfermedad.

El Profesor Osuna en su discurso de ingreso titulado “Comunicación Parásito-Célula; el sutil y engañoso susurro que mantiene el parásito *Trypanosoma cruzi*” nos va a ilustrar sobre el sistema de comunicación que el parásito mantiene con las células de su hospedador para invadirlas, multiplicarse y evadir la respuesta inmunitaria. La invasión de la célula hospedadora no es un ataque frontal, sino un proceso mediado por la interacción de moléculas y mecanismos que confunden al sistema de defensa. En esta “sugerente y silenciosa” manipulación, desempeñan un papel destacado las exovesículas liberadas por el parásito, que actúan como mensajeros, transmitiendo información genética y proteica a la célula del huésped y es la base de la permanencia del parásito y la consiguiente persistencia de la enfermedad de Chagas.

Señor Presidente, señores académicos, señoritas y señores.

Hoy acogemos al Profesor Antonio Osuna Carrillo de Albornoz. Permítanme que en nombre de quienes constituyimos la Real Academia de Medicina y Cirugía de la Región de Murcia le exprese nuestra más calurosa acogida. Antonio, bienvenido a esta Corporación. Pasa y toma sosiego en ella, donde encontrarás lugar para la luz del conocimiento, el razonamiento y la grata discrepancia.

He dicho.

Discurso de ingreso

**‘Parásito-Célula; el sutil y engañoso
susurro que mantiene el parásito
Trypanosoma cruzi’**

por

Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento y la profunda satisfacción que me produce estar hoy en esta Real Academia de Medicina, una institución clave en la promoción y el desarrollo de las Ciencias Biomédicas en esta región. Al igual que en mi tierra, la Universidad y la Academia han sido y continúan siendo motores esenciales del progreso social y cultural desde su fundación.

La Real Academia de Medicina de la Región de Murcia, ejemplo temprano para otras Academias, ha contribuido desde su creación en la época de la Ilustración —hace ya más de dos siglos— a la difusión de la ciencia en general y al avance del conocimiento médico y de las disciplinas científicas vinculadas a la sanidad, participando de forma inequívoca en la resolución de problemas de salud pública en esta región.

Permítanme manifestar también mi preocupación por la dificultad que supone para mí estar a la altura del nivel intelectual de los miembros de esta institución, más aún al proceder de una disciplina que, si bien no está alejada de los principios fundacionales de esta Academia, representa para mí el reto de estar a su nivel. Quiero agradecer al Sr. Presidente y a los académicos que valoraron y aceptaron mi candidatura, en especial a la Ilustrísima Señora D^a. María de los Ángeles Rodríguez González, quien promovió mi nombramiento como académico correspondiente y a los Ilustrísimos Señores D^a Luisa Jimeno García y D. Juan Antonio Ruipérez Abizanda que la avalaron. Extiendo igualmente mi agradecimiento a otros académicos cercanos, como el Sr. Presidente, el Excelentísimo Sr. D. Manuel Segovia Hernández; al Excelentísimo Sr. D. Eduardo Osuna Carrillo de Alborno, mi hermano, quien a propuesta del Pleno

va a realizar mi presentación —sin duda, desde una perspectiva nada objetiva— y que probablemente haya visto colmado así el último deseo familiar: que yo hubiera sido médico sino un investigador que trabaja en temas relacionados con la salud humana. No soy médico, ni un parasitólogo clásico; soy, más bien, un Biólogo-Parasitólogo, que utiliza a los parásitos como modelo de estudio de las interrelaciones parásito/hospedador, al menos así me considero.

Mi labor se enmarca en el ya consolidado concepto “Una Salud” o One Health, según el cual los animales infectados actúan como reservorios de enfermedades infecciosas para los seres humanos y, a su vez, los humanos podemos ser reservorios de enfermedades que afectan a los animales. Entre ellas se incluyen numerosas patologías parasitarias —protozoosis y helmintosis—, así como enfermedades bacterianas y, como tristemente hemos experimentado en los últimos años, diversas infecciones víricas emergentes. Los agentes infecciosos, que han producido históricamente las pandemias, las actuales y las que con seguridad nos llegarán.

Permitanme, en un momento tan significativo para mí, expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas a quienes debo gran parte de lo que soy; en especial, a quienes me formaron y continúan enseñándome, permitiéndome dedicarme con intensidad y vocación a un trabajo que me apasiona. Extiendo también ese agradecimiento a todas las personas que han formado parte de mi grupo de investigación y a quienes se formaron conmigo, porque sin su contribución no habría sido posible alcanzar los logros conseguidos hasta ahora. Y, por supuesto, a todos los miembros de mi familia, que han compartido y sufrido mi dedicación, mis tres Hijos, Maite, y también como no, mis hermanos.

El conocimiento que poseemos es la herencia de quienes nos dedicaron su tiempo para enseñarnos.

Al redactar este discurso de agradecimiento, he recordado los primeros momentos familiares que forjaron en mis hermanos, Ignacio y Eduardo, y en mí, una temprana vocación por la ciencia, especialmente por la biomedicina. Aquellas conversaciones despertaban inquietudes intelectuales que, de forma intuitiva y a veces inconsciente, he tratado de transmitir a mis propios hijos. Considero que con éxito: dos de ellos se dedican hoy a la ciencia —uno al estudio del comportamiento animal, con gran pasión por la divulgación científica, y

mi hija a la genética evolutiva—, si bien, lamentablemente, ambos desarrollan su carrera fuera de nuestro país. Casi a diario, aunque sea por teléfono, conversamos sobre sus experimentos, sus publicaciones y sus proyectos.

No puedo dejar de recordar a mi Padre, médico gastroenterólogo con una profunda vocación investigadora, alentada desde su infancia por su tío Fidel, Fidel Fernández Osuna, catedrático de Patología de la Universidad de Granada. Fidel, fue uno de los primeros científicos en estudiar el parasitismo humano en el sureste de España, en particular la leishmaniasis y las helmintiasis intestinales, tema sobre el que versó su tesis doctoral. Mi padre vivió la docencia y la investigación como auténtica pasión, que transmitía a diario. En los almuerzos, viajes o excursiones buscaba siempre un momento para hablarnos de fisiología, fisiopatología, de enfermedades “exóticas”—fruto de su gran interés por la medicina tropical— o para comentarnos las últimas novedades en investigación biomédica. También compartía sus hipótesis sobre el papel del núcleo en el cáncer, la desregulación del citoplasma y la membrana en distintas patologías o la implicación del sistema nervioso en la enfermedad. Cuánto habría disfrutado al leer el reciente artículo publicado en *Nature Neuroscience*, “Neural anticipation of virtual infection triggers an immune response”, donde se demuestra que la mera visualización del riesgo de contagio mediante realidad virtual activa los mecanismos celulares de la inmunidad innata.

Inició su tesis doctoral sobre la lepra en la Leprosería de Granada, (Hospital de San Lázaro) en un proyecto sumamente ambicioso para la época, y aun no resuelto, centrado en el cultivo “in vitro” del entonces llamado “bacilo de Hansen” (*Mycobacterium leprae*) y su posible inactivación con fines inmunoprofilácticos. Sin embargo, al igual que le sucedería después a mi abuelo materno, su carrera científica quedó truncada por las circunstancias socioeconómicas del momento. En nosotros proyectó sus ilusiones, como solemos hacer los padres con los hijos.

Mi abuelo materno, farmacéutico titular, fue discípulo del profesor Obdulio Fernández Rodríguez, catedrático de Química Orgánica de las Universidades de Granada y, posteriormente, de la Central (hoy Universidad Complutense). D. Obdulio, llegó a presidir la Real Academia de Farmacia y fue un adelantado a su tiempo. Ya en 1913 publicó un libro sobre la necesidad de fortalecer la

relación entre la industria y la universidad (lo que hoy llamaríamos transferencia tecnológica) con el objetivo de impulsar la industria española y la economía del país. Cuando D. Obdulio se trasladó a Madrid intentó, sin éxito, por motivos económicos, que mi abuelo lo acompañase. Aquel hecho se convirtió, sin duda, en la espina que le acompañó toda su vida.

Durante las numerosas vacaciones que pasamos con mi abuelo, siempre encontraba un momento para llevarnos a la rebotica, donde tenía su laboratorio. Me enseñó preparaciones teñidas con Giemsa, azul de metileno, tricrómico o verde de malaquita, todas realizadas por él mismo. Determinar glucosa con el reactivo de Fehling o amoniaco con el de Nessler. Su frase recurrente, cuando le hacía una pregunta, era siempre: “Antoñito, piensa”. Esperaba mi respuesta y luego explicaba la solución correcta. Gracias a él aprendí nombres científicos de plantas, reactivos químicos y varios parásitos (entre ellos *Taeniarhynchus saginatus*, *Trichinella*, *Echinococcus* o *Bothriocephalo*). También nos enseñaba experimentos químicos, a menudo con resultados “explosivos”, y narraba con entusiasmo cómo montó junto a su hermano médico, la primera central hidroeléctrica artesanal de Canillas de Albaida, en la Axarquía malagueña, actualmente en ruinas, pero aún conocida como la central de los “Carrillo”.

Tuve también la fortuna de contar, desde la adolescencia, con profesores que alimentaron mi curiosidad científica. El Dr. Ángel Sedano, profesor de Ciencias Naturales que nos llevaba a algunos estudiantes de bachillerato, a la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) en Granada, donde realizaba su tesis en cotutela con el Instituto Pasteur de París. Más adelante, el profesor Diego Guevara Pozo, director del Instituto Nacional de Parasitología “López-Neyra” y mi director de tesis, me transmitió una visión amplia, integradora y pluridisciplinar de la parasitología, apoyada en conceptos fisiológicos, bioquímicos e inmunológicos y en la idea central de la “dependencia metabólica” de los parásitos frente a sus hospedadores. También guardo un profundo reconocimiento a D. Enrique Montoya, catedrático de Microbiología y Virología; a D. José González Castro; y a D. Miguel Monteoliva del CSIC, (Instituto “López-Neyra”). Y debo destacar, de forma muy especial, el ejemplo y los consejos de D. Federico Mayor Zaragoza, mi catedrático de Bioquímica. Gracias a él, durante mi etapa de estudiante, pude escuchar en Granada a figuras

como Krebs, Arthur Kornberg, Severo Ochoa, Aleksandr Spirin o Juan Oró, a quienes invitaba para impartir conferencias o recibir el nombramiento de Doctor Honoris Causa.

Al finalizar mis estudios de Biología —ni farmacéutico ni médico, contra lo esperado y, aun así, sin el menor reproche por parte de mi padre o de mi abuelo; solo el significativo gesto de que mi abuelo vendiera la farmacia al licenciarme— obtuve una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) en el CSIC. Comencé entonces mi tesis bajo la dirección del profesor Guevara, rompiendo con la parasitología clásica en un tema para mi excitante “el cultivo *in vitro* de helmintos parásitos” (*Fasciola hepatica* y *Taenia spp.*), con el objetivo de desentrañar sus dependencias metabólicas y las relaciones parásito-hospedador. Fueron años de intensa formación, tanto en Granada como en el Imperial College de Londres, de la mano del profesor J. D. Smyth, Parasitólogo-Fisiólogo, especializado en helmintos, especialmente en *Echinococcus*. Aquella estancia, financiada con la beca FPI y la del British Council, me permitió defender la tesis —premiada con el Premio Extraordinario— y realizar posteriormente otra estancia en el Reino Unido, en el centro de la FAO en Guildford, bajo la supervisión del Dr. J. Seller, donde entonces trabajaban en el virus de la fiebre aftosa. Fue allí donde nació mi interés por los patógenos intracelulares.

A mi regreso, y tras obtener una plaza de profesor ayudante, compaginé la docencia con la investigación en el Instituto “López-Neyra”. Desde allí publicamos estudios sobre el cultivo *in vitro* de cestodos (*Taenia hydatigena* y *Taenia pisiformis*), en los que conseguimos, a partir del estadio de cisticerco, individuos con la genitalia formada, aunque sin desarrollo de anillos grávidos; un resultado análogo al obtenido con el trematodo *Fasciola hepatica*. Estos trabajos fueron para mí un fuerte aliciente, pues Angela Taylor los recogió en su libro *Methods of Cultivating Parasites in Vitro* (Academic Press, 1978).

En esa época dirigí varias tesinas de licenciatura sobre cultivo con *Hymenolepis* y comencé a purificar antígenos secretados como fuente antigenética para el diagnóstico inmunológico de las helmintiasis. Años después, esa línea me permitió desarrollar una serie de publicaciones en una línea de trabajo sobre diagnóstico de la hidatidosis.

El “gusanillo” del cultivo de organismos intracelulares pronto hizo efecto. Inicié la dirección de mi primera tesis doctoral —dirigida a la Dra. Jiménez Ortiz— sobre el desarrollo intracelular del organismo que ha ocupado la mayor parte de mi carrera: *Trypanosoma cruzi*. A esta tesis le siguieron muchas otras.

Este protozoo, bien conocido por los miembros de esta Academia, causa una enfermedad que la Organización Mundial de la Salud considera “la más importante de las olvidadas”. Afecta a unos ocho millones de personas en el mundo, es endémica en 21 países de América —incluido el sur de Estados Unidos— y se transmite de forma natural por insectos Triatominos (chinches hematófagas). A diferencia de otras enfermedades transmitidas por artrópodos —*Plasmodium*, virus del Nilo Occidental, virus del Zika, fiebre amarilla, chikunguña o filariosis—, no se transmite por la saliva durante la picadura, sino por las heces del insecto, que contienen las formas infectantes para mamíferos incluido el hombre (tripomastigotes metacíclicos). Al entrar en contacto con la piel lesionada o mucosas, estas formas penetran en nuestras células y se multiplican. Dado que la transmisión depende de la defecación sobre el huésped, algunas chinches del norte de las zonas endémicas de EE. UU., aunque susceptibles de infectarse en la naturaleza, apenas contribuyen a la epidemiología humana porque no defecan sobre la piel tras alimentarse. La enfermedad en su fase crónica hace que muchos de los pacientes parasitados, sufran graves daños cardíacos que puede causar la muerte súbita o síndromes mega a nivel intestinal, causando una serie de pérdidas por causa directa o en pérdidas de horas trabajadas estimadas, solo en USA en el año 2023, superiores en 1.9 veces las causadas por el HIV, 8.8 veces las causadas por la Malaria o 36 veces las que ocasiona la tuberculosis (Steffany Vucetich et al. Lancet.2024).

Inicialmente restringida a América, la enfermedad adquirió relevancia global por las migraciones humanas. En España —segundo país en número de casos importados tras EE. UU.— se estima que viven unas 60 000 personas afectadas, muchas infradiagnosticadas y no tratadas. Los principales riesgos de transmisión, en áreas donde la enfermedad es importada, son las transfusiones, los trasplantes de tejidos u órganos y la transmisión vertical madre-feto. Debe destacarse que un miembro de esta Academia (el Sr. Presidente) fue

pionero en el control de la transmisión vertical, implantando protocolos de cribado y diagnóstico en todas las gestantes de la Región de Murcia, con independencia de su procedencia; su iniciativa y experiencia ha despertado interés en otros países europeos, como Suiza.

En 1909, Carlos Chagas identificó las formas del parásito en el intestino del insecto vector y describió su desarrollo intracelular obligado en mamíferos, así como las fases aguda y crónica de la enfermedad. Años después, el médico argentino Salvador Mazza amplió el conocimiento sobre sus manifestaciones clínicas y su extensión geográfica, hasta el punto de que algunos autores se refieren a la tripanosomiasis americana como enfermedad de Chagas-Mazza.

La primera cepa del parásito con la que trabajamos, nos la donó el Dr. Blázquez, del Instituto Nacional de Microbiología de Majadahonda (actual Instituto de Salud Carlos III). El Dr. Gabaldón —insigne malariólogo venezolano— la había aislado en Maracay (Venezuela) tras capturar chinches infectadas en el entorno del lago e infectar ratones con los protozoos obtenidos del recto de los insectos. Trasladamos la pareja de ratones infectados al Instituto “López-Neyra” y, tras mantener la cepa por pases en ratón, la compartimos con el Departamento Interfacultativo de Parasitología de la Universidad de Granada, al que yo también pertenecía y he desarrollado mi actividad.

Nuestros primeros estudios se centraron en el cultivo *in vitro* del protozoo. Empleamos medios bifásicos tradicionales —agar-sangre con diferentes fases líquidas—medios líquidos, inspirados en mi experiencia previa con cultivos de fases tisulares de *F. hepatica*, con el objetivo de obtener masa de epimastigotes destinados a estudios bioquímicos y a la producción de antígenos. Suplementamos los medios con extractos de *Rhodnius prolixus*—procedentes del insectorio que creamos con triatominos recibidos también del Dr. Blázquez— y en medios adaptados para células de insecto.

Por azar y nada más que por azar, uno de las veces que preparábamos medio Grace, para el cultivo de células de insecto, al ajustar el pH del mismo, la chica que lo preparaba aumentó la concentración de ácido clorhídrico, lo que le obligó a añadir una mayor cantidad de hidróxido sódico, se esterilizó y a los 7 días empezamos a ver en el sobrenadante del medio gran cantidad de formas muy delgadas que bajo tinción resultaron ser formas tripomastigotas metací-

clicas y que alcanzaban casi un 90% del total de las formas del cultivo. A partir de ese momento y tras repetir, en función de las anotaciones del cuaderno de laboratorio, comenzamos a usar ese medio, confirmándose la capacidad infectiva tanto para células en cultivo como “*in vivo*” en ratón, lo que nos permitió disponer en cantidad, las formas infectivas del parásito.

Paralelamente, continué con el estudio de amebas de vida libre, y publicamos los resultados sobre el cultivo “*in vitro*” de helmintos y de las llamadas “amebas come-cerebros”: *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, en revistas internacionales. Los trabajos con *T. cruzi* crecieron en alcance: estudiamos la interacción parásito-célula (en macrófagos y células HeLa), el metabolismo glucídico y energético de formas infectivas y no infectivas, y distintos aspectos del cultivo y de la invasión celular. Publicamos inicialmente en la *Revista Ibérica de Parasitología* (CSIC) y posteriormente en revistas internacionales. Esta mayor visibilidad atrajo la colaboración de varios laboratorios farmacéuticos (Made, Esteve, Antibióticos S.A., Janssen Pharmaceutica), interesados en evaluar nuevas moléculas con potencial quimioterápico frente a *T. cruzi*. Aun así, una tras otra sufrímos una decepción recurrente: compuestos prometedores “*in vitro*” fracasaban “*in vivo*”. Pese a ello, esos ensayos generaron financiación adicional, publicaciones y una infraestructura de laboratorio solvente. También nos permitió probar los compuestos en otros parásitos, como las amebas anfizoicas y, claro, aumentar el currículum del grupo de investigación. La colaboración con la empresa belga SOPAR dio lugar a la primera patente conjunta de la Universidad de Granada con una empresa: un método de encapsulación de anfotericina B en nanopartículas de cianoacrilato para tratar la leishmaniasis canina.

A modo de ejemplo del volumen de trabajo, ensayamos más de 6000 compuestos procedentes de la colección de moléculas con actividad farmacológica de uno de los laboratorios mencionados. Y sin el uso de “robots” como actualmente se emplea. Iniciamos además colaboraciones con grupos de síntesis orgánica e inorgánica: con el profesor Jacques Barbe (Université de la Méditerranée, experto en acridinas), con el profesor Dan Craciunescu (Universidad de Bucarest y, posteriormente, Universidad Complutense de Madrid) y con los doctores José Elguero y Rosa Claramunt (Instituto de Química Médica, CSIC).

A su regreso a España, el Dr. Elguero —más tarde presidente del CSIC— impulsó propuestas de mejora de la gestión científica, algunas de las cuales, como suele ocurrir, desgraciadamente, en mi opinión, no llegaron a implementarse. La colaboración con el Instituto de Química Médica continuó de forma intermitente con la Dra. Pilar Navarro y el Dr. Christophe Dandoville.

Durante esos años visité casi semanalmente el Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid. Asistí a seminarios internos y conferencias y aprendí de primera mano técnicas de biología molecular aplicables al estudio de ácidos nucleicos: secuenciación, clonación, recombinación, marcado radiactivo y autoradiografía. Las aplicamos a *T. cruzi* para investigar el metabolismo glucídico en sus diferentes formas, el papel del calcio en la interacción parásito-célula, la refractariedad a reinfecciones en células previamente infectadas y, con recursos artesanales, montamos un equipo de PCR. Muchas de estas observaciones aún se citan; otras siguen sin explicación, como el aumento del volumen nuclear en células infectadas sin incremento concomitante de síntesis de ADN, o el flujo de macromoléculas marcadas radiactivamente desde el parásito hacia el núcleo celular.

El acuerdo entre la Universidad de Granada y la Universidad de Gante —fundamentado en sus vínculos históricos con el emperador Carlos I— favoreció el intercambio de profesorado. A propuesta del Prof. De Rycke, director del Departamento de Zoofisiología e investigador en fisiología de cestodos, impartí en esa Universidad, durante varios años clases sobre cultivo de helmintos y codirigí la tesis doctoral del Dr. Dirk Janssen acerca de la inmunomodulación ejercida por el líquido hidatídico sobre células linfoides. Publicamos sucesivos trabajos sobre la respuesta humoral aplicable al diagnóstico y pronóstico de la hidatidosis humana, la caracterización antigenica de inmunocomplejos circulantes y desarrollamos, mediante un proyecto EUREKA de la UE, un kit de diagnóstico basado en captura y cuantificación de IgE frente al antígeno B del líquido hidatídico.

En paralelo estudiamos y publicamos la fisiología de células parasitadas por amastigotes intracelulares: aumento del calcio citosólico y movilización del catión desde depósitos internos; efecto del interferón α/γ sobre la multiplicación e invasión; y cambios del pH intracelular relacionados con la evasión lisosomal.

Observamos que las células infectadas resisten la toxina diftérica —que requiere procesamiento por parte de los lisosomas— y, por el contrario, son más sensibles a la ricina, más tóxica en células con pH intracelular relativamente básico. En suma, las células parasitadas por *T. cruzi* resisten la acción de la toxina diftérica y muestran hipersensibilidad a la ricina.

Es bien conocido que las células liberan sustancias de diversa naturaleza química que facilitan la cooperación intercelular; los parásitos no son una excepción. Este conjunto de moléculas secretadas —que les permite digerir, crecer, evadir la respuesta inmune y colonizar al hospedador— constituye el “secretoma”.

La infección celular por *T. cruzi* conlleva, como se ha indicado, múltiples alteraciones: movilización de calcio desde depósitos intracelulares, cambios del citoesqueleto y permeabilización de la membrana plasmática a macromoléculas, inducidos por el secretoma del parásito, lo que se ha llamado TESA, empleado en los diagnósticos inmunológicos.

El estudio de las proteínas secretadas y de sus efectos durante el contacto inicial e invasión marcó el inicio de mi línea actual. Identificamos que, al contactar con la célula diana, los parásitos secretan una proteína de 56-60 kDa capaz de disminuir la síntesis proteica de la célula, y que reproducían algunos de los cambios fisiológicos de las células parasitadas y permeabilizar la membrana, de modo que macromoléculas como α -sarcina —ribotoxina de *Aspergillus giganteus* de ~17 kDa, sin receptor en la membrana celular — acceden al citosol y bloquean la síntesis proteica mediante modificación específica e irreversible del ribosoma; un excelente marcador de permeabilización. La incubación celular con la proteína purificada reprodujo, como he mencionado, varias de las alteraciones observadas en la interacción parásito/célula. Además, al adsorberla en partículas de bentonita, estas partículas fueron endocitadas y localizadas en el citoplasma; hecho que no observamos con partículas recubiertas con otras proteínas. Y los anticuerpos específicos frente a esta proteína bloquearon la entrada de formas infectantes en células no fagocíticas.

La secuenciación reveló que la proteína pertenece a la superfamilia de las “mucin-associated surface proteins (MASP)”, familia exclusiva de *T. cruzi*, con ~1 500 genes y ~500 pseudogenes, sin ortólogos en otros parásitos ni en ma-

míferos. Las MASP representan $\approx 6\%$ del genoma del parásito. La publicación del genoma de *T. cruzi* por un consorcio internacional (El-Sayed y cols., 2005) nos permitió profundizar en esta familia. Sus miembros se acumulan en el aparato de Golgi y, tras su secreción, se anclan a la membrana mediante GPI. Comparten una región N-terminal con péptido señal (secreción) y una región C-terminal (anclaje por GPI) que flanquean una región central hipervariable, presumiblemente clave en la interacción parásito-célula y, por analogía con *T. brucei*, potencialmente implicadas en la variación antigénica; esta última hipótesis sigue sin confirmarse. Nuestra MASP-52 es, hasta la fecha, la única con función demostrada en la interacción parásito-huésped, al facilitar la invasión celular. El desarrollo de anticuerpos frente a las regiones constantes (péptido señal y C-terminal), mediante péptidos sintéticos, nos proporcionó marcadores específicos para estudiar el secretoma particulado.

Investigamos el mecanismo de secreción de estas proteínas mediante microscopía electrónica (transmisión y barrido). Ahí, observamos la liberación de pequeñas vesículas ($\approx 100-200\text{ nm}$) a través de la bolsa del flagelo —desde los llamados cuerpos multivesiculares— que se fusionaban con la membrana de dicha bolsa. Con Microscopía de barrido de alta resolución comprobamos además que, en la superficie de todas las formas del parásito —epimastigotes (no infectivos), tripomastigotes (infectivos) y amastigotes intracelulares aislados y purificados— se formaban y liberaban vesículas esféricas rodeadas de membrana, de mayor tamaño ($\approx 200-500\text{ nm}$). Concluimos que, además del secretoma soluble, *T. cruzi* libera un secretoma particulado constituido por exovesículas: exosomas (partículas pequeñas) y ectosomas (partículas de mayor diámetro).

La primera descripción de las exovesículas data de 1967. En ese trabajo se identificaron, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), factores protrombóticos inicialmente considerados lipoproteínas, localizados en pequeñas vesículas liberadas por plaquetas y denominados “desechos plaque-tarios” (Wolf, 1967). Se informó de un tamaño de unos 50 nm y una densidad de 1,020-1,025 g/mL. Años después, Dalton observó numerosas vesículas de tamaño similar en suero fetal bovino (Dalton, 1975). En 1983 se describió que los reticulocitos de rata y oveja exportaban transferrina en condiciones nativas al

medio extracelular (Pan & Johnstone, 1983). No fue hasta 1987 cuando se atribuyó función a estas vesículas: Johnstone demostró que las vesículas extracelulares (EV) liberadas por reticulocitos ovinos conservaban características de la membrana plasmática —incluido el receptor de transferrina—, mientras que actividades enzimáticas citosólicas no resultaban detectables. Concluyó así que la externalización vesicular constituye un mecanismo de liberación selectiva de componentes de membrana (Johnstone et al., 1987).

Hoy sabemos que las EV desempeñan un papel central en la comunicación intercelular no mediada por contacto directo a través de los desmosomas. Como nanopartículas presentes en fluidos biológicos, pueden actuar a escala sistémica/endocrina (células distantes), paracrína (células cercanas), yuxcrína (células adyacentes) e incluso autocrína (sobre la propia célula) (Barteneva et al., 2013; de Pablos Torró et al., 2018; Yáñez-Mó et al., 2015). Se ha estudiado más su papel en estados patológicos que en su función fisiológica, su función depende del cargo, el cual a su vez depende del tipo celular de origen y del estado fisiológico del organismo, es decir no todas las exovesículas son iguales y no todas deben tener la misma función, lo que implica que todas las células del organismo, actúan como diferentes “glándulas”, de funciones aun por desentrañar.

En las primeras descripciones se empleó el término exosoma. A la luz de los avances en tamaño, densidad, biogénesis y composición, hoy distinguimos varias poblaciones: cuerpos apoptóticos, ectosomas o microvesículas y exosomas. Siguiendo las recomendaciones de la International Society for Extracellular Vesicles, usamos el término general vesículas extracelulares o exovesículas, que pueden clasificarse por tamaño y origen (Théry et al., 2018; Witwer et al., 2021). Las de mayor tamaño son los cuerpos apoptóticos, que pueden alcanzar varias micras de diámetro, en ellas se encuadran las que se han denominado como “migrasomas” partículas formadas por la membrana plasmática con restos de citoplasma en su interior adherida a los sustratos o los “oncosomas”.

Como es conocido, la apoptosis es un proceso de muerte celular programada inducible por múltiples estímulos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y ocurre en organismos multicelulares y unicelulares (levaduras, bacterias y protozoos) (Citterio et al., 2015; de Souza et al., 2003; Falcioni et al., 2008).

Los cuerpos apoptóticos son las exovesículas de mayor tamaño, con un diámetro de entre 500 y 5 000 nm (Akers et al., 2013; Battistelli & Falcieri, 2020). Presentan una densidad de 1,16-1,28 g/mL y una morfología heterogénea (van der Pol et al., 2012). Se liberan al medio extracelular por gemación de la membrana plasmática, un proceso regulado por diversas enzimas quinasas (moleculas que transfieren grupos fosfato desde el ATP a otras proteínas) como PAK2, LIMK1 y ROCK1. Estas activan a Rac1 y CDC42, que remodelan el citoesqueleto. Posteriormente, otras enzimas como Pannexin-1 y Plexin-B2 facilitan la formación de las vesículas (Santavanond et al., 2021; van der Pol et al., 2012).

Para mantener la homeostasis, el sistema inmunitario debe eliminar estos cuerpos; de lo contrario, su acumulación puede inducir respuestas autoinmunes al exponer autoantígenos que normalmente permanecen ocultos (como ADN, histonas o mitocondrias). Este fenómeno se ha relacionado, con el lupus eritematoso sistémico (Bilyy et al., 2012; Muñoz et al., 2010) y podría también contribuir a la formación de autoanticuerpos en la enfermedad de Chagas (anti-actina, anti-mitocondriales, antinucleares).

El siguiente grupo en tamaño lo constituyen los ectosomas (también llamados microvesículas o micropartículas), que miden entre 150 y 500 nm (Kalluri & LeBleu, 2020), un rango que puede solaparse con el de los exosomas. Aun así, se han identificado biomarcadores relativamente específicos de los ectosomas, como metaloproteinasas, glicoproteínas (GPIb, GPIIb, P-selectina), integrinas (por ejemplo, Mac-1) y otras proteínas (ATP5F1A/B, DHX9, GOT2, HSPA5, HSPD1, MDH2, STOML2) (Gasser et al., 2003; Liu et al., 2022; Mezouar et al., 2015), generalmente presentes en la membrana plasmática.

Al igual que los cuerpos apoptóticos, los ectosomas se originan a partir de la membrana plasmática por gemación o evaginación. Su membrana es rica en colesterol, diacilglicerol y fosfatidilserina en la cara externa (Théry et al., 2009). En *Trypanosoma cruzi*, los ectosomas transportan la mayor parte de las mucinas y proteínas MASP, junto con proteínas y lípidos propios de las “balsas lipídicas” (“o “dominios rafts”) de la membrana. Su formación depende de la redistribución de los fosfolípidos y de la contracción del citoesqueleto. Intervienen en este proceso las translocasas de fosfolípidos: las flipasas (que

trasladan lípidos desde la cara externa hacia la interna) y las flopzas (en sentido inverso). La exposición de fosfatidilserina en la superficie celular induce la evaginación, que se completa mediante interacciones entre actina y miosina (Akers et al., 2013). La acción de estas enzimas podría contribuir a la permeabilización celular inducida por las exovesículas del parásito.

Aunque los ectosomas están presentes en la mayoría de los fluidos biológicos, su liberación aumenta durante el estrés celular (Théry et al., 2009; van der Pol et al., 2012). Su contenido y función son variados y, en general, menos conocidos que los de los exosomas, probablemente debido a su mayor heterogeneidad y a que sus rutas biogénicas parecen menos reguladas que las de los exosomas (Kalra et al., 2016).

Entre las vesículas rodeadas por membrana se encuentran los exosomas; y, además, se han descrito muy recientemente, partículas denominadas exómeros, que carecen de membrana. Desde su descubrimiento, la comunidad científica ha estudiado su contenido, su formación y sus funciones tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Los exosomas miden entre 30 y 150 nm (Kalluri & LeBleu, 2020) y presentan una densidad de 1,13–1,19 g/mL. Su morfología clásica bajo microscopía electrónica de transmisión recuerda a una “copa”, aunque mediante microscopía de fuerza atómica pueden observarse con forma “lagrimal” (Akers et al., 2013; van der Pol et al., 2012), al igual que los exosomas de las formas infectantes de *T. cruzi*.

Los exómeros, por su parte, son nanopartículas sin membrana de 30–50 nm, compuestas principalmente por proteínas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos. También los hemos detectado en *T. cruzi*, y constituyen el objeto de un estudio actualmente en preparación.

A diferencia de los ectosomas y los cuerpos apoptóticos, los exosomas se forman dentro de los endosomas mediante un proceso altamente regulado. En su biogénesis participan numerosas proteínas que actúan como marcadores, y puede desarrollarse a través de rutas dependientes o independientes del complejo ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) (Han et al., 2022; Zhang et al., 2020). El complejo ESCRT está formado por los subcomplejos ESCRT-0, -I, -II, -III y la ATPasa VPS4 (*vacuolar protein sorting 4*) (Hurley, 2010). ESCRT-0 reconoce proteínas ubiquitinadas —por ejemplo,

mediante su dominio FYVE, que se une al fosfatidilinositol-3-fosfato—. Posteriormente, los complejos ESCRT-I y ESCRT-II facilitan el ensamblaje de ESCRT-III. Tras la hidrólisis de ATP por VPS4, ESCRT-III elimina la ubiquitina de las proteínas incorporadas en las vesículas intraluminales (ILV) y deforma la membrana para producirlas.

También se han descrito mecanismos alternativos, independientes de ESCRT, mediados por proteínas como Alix y HD-PTP (Gurunathan et al., 2021; Han et al., 2022; Pfitzner et al., 2020; Schöneberg et al., 2017). Estas vías suelen depender de proteínas ancladas a las balsas lipídicas, como la esfingomielinasa neutra 2 (nSMase2), caveolina-1, flotilina-1, tetraspaninas y colesterol (Han et al., 2022). Asimismo, las prohibitinias I y II (proteínas con las que hemos trabajado sobreexpresando o eliminando sus genes en *T. cruzi* y *Leishmania*) parecen participar tanto en la eliminación de radicales superóxido como en la capacidad de multiplicación intracelular de ambos parásitos (Cruz Bustos et al., 2018; Ibarrola et al., 2021).

Otras proteínas, como caveolina-1 o la enzima de membrana nSMase2, también desempeñan un papel activo en la formación de estas exovesículas. Caveolina-1, además, actúa como andamiaje en el ensamblaje lipídico-proteico, inicia la formación de caveolas y participa en la endocitosis dependiente de caveolina (Parton et al., 2020). Flotilinas y prohibitinias (proteínas de las “balsas lipídicas” o “dominios raft”) intervienen en el tráfico endosomal (Kwiatkowska et al., 2020).

Por último, las tetraspaninas (CD9, CD37, CD63, CD81, CD83) forman micro dominios que reclutan otras proteínas y modulan la señalización celular. Aunque *T. cruzi* carece de genes que codifiquen estas proteínas, los exosomas de otros organismos sí las contienen. En *T. cruzi*, los exosomas carecen de tetraspaninas, pero presentan abundantes MASP, trans-sialidasas y otras proteínas de membrana específicas (De Pablos et al., 2016; Díaz-Lozano et al., 2017). En la formación de las ILV, las tetraspaninas modulan el contenido y desempeñan un papel esencial en la biogénesis exosomal (Kummer et al., 2020; Ma et al., 2021; van Niel et al., 2011).

Se han propuesto mecanismos de liberación y edición del contenido vesicular mediados por Rac1 y CDC42, que favorecen la formación de filamentos de

actina (actina-F), la generación de ILV y la exocitosis de exosomas (Ekström et al., 2014; Kajimoto et al., 2013). Estas mismas proteínas modifican su expresión durante la interacción con exosomas derivados de *T. cruzi*.

Antes de su liberación, los cuerpos multivesiculares (MVB) maduran tras interactuar con el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, las mitocondrias y los lisosomas (Kwon et al., 2016; Rabas et al., 2021). En este proceso incorporan enzimas citosólicas, metabolitos, proteínas del citoesqueleto (actina, miosina, tubulinas), moléculas del MHC I/II, proteínas de estrés, ADN mitocondrial y nuclear (a veces unido a histonas o asociado a la superficie vesicular) (Orrego et al., 2021), así como ARN mensajeros, de transferencia, microARN y ribosomales. Los fragmentos de ADN encontrados en exosomas suelen medir alrededor de 200 pb. Como dato curioso, los exosomas purificados de suero contienen aproximadamente un 30-75 % de microARN, un 10-20 % de ARNm y un 5-30 % de ARNr, mientras que los exosomas derivados de orina presentan un 2-10 % de microARN, un 5-12 % de ADN mitocondrial y un 30-60 % de ARNr.

En suma, el contenido de las EV varía según la célula de origen y su estado fisiológico o patológico.

Durante años, la funcionalidad de las exovesículas fue controvertida. Inicialmente se consideraron vías de eliminación de desechos proteicos y de otras macromoléculas. Hoy sabemos que, en particular los exosomas, cumplen funciones esenciales en la fisiología, como revisaremos más adelante. A modo de anécdota: en uno de nuestros primeros congresos mostrando, por microscopía electrónica, exovesículas en *T. cruzi*, un asistente —de renombre— preguntó por qué “perdímos el tiempo” estudiando la “basura” que excretan los parásitos (realmente fue más escatológica la palabra empleada). Respondí que, del mismo modo que se estudiaban las excretas para entender algunas patologías, nosotros analizamos lo que excretaban de forma particulada estos protozoos.

En conjunto, exosomas y, en general, todas las exovesículas constituyen una vía alternativa de secreción para proteínas sin péptido señal, y también un vehículo para otras macromoléculas (Schorey & Bhatnagar, 2008).

Las células pueden incorporar y secretar exosomas de forma simultánea; las tasas de entrada y salida varían según su estado fisiológico, lo que respalda que los exosomas inducen selectivamente señales de activación o represión de

rutas biosintéticas y/o metabólicas en células receptoras, modulando procesos de desarrollo, respuesta inmune y enfermedad (Kalluri & LeBleu, 2020). Además, los ácidos nucleicos presentes en exosomas son biológicamente activos y permiten intercambio de información genética tanto en células eucariotas como en procariotas, con efectos en la regulación postraduccional de la célula diana (Montecalvo et al., 2012; van der Pol et al., 2012). Su acción como ya se ha indicado puede ser endocrina, paracrína, yuxtacrina o autocrina, según las células con las que interactúan (de Pablos et al., 2017).

Se ha estudiado, entre otros, 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 β pancreáticas, el tejido adiposo, los músculos esqueléticos, o en el hígado (Guay & Regazzi, 2017). Asimismo, en modelos de obesidad, 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 los exosomas circulantes, los cuales promueven la resistencia a la hormona en el tejido adiposo blanco de los ratones (Castaño et al., 2022; Z. Deng et al., 2009). Exosomas secretados por cultivos de células humanas y murinas (células endoteliales, células progenitoras cardíacas, fibroblastos cardíacos, cardiomiositos) se han asociado con la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes y la adaptación metabólica asociada con la insuficiencia cardíaca (Zhang et al., 2017). Por último, el efecto protector frente a la aterosclerosis se ha demostrado en ratón: donde exosomas derivados de plaquetas reducen la expresión del receptor CD36 en macrófagos y disminuyen la captación de LDL (“colesterol malo”) (Srikanthan et al., 2014).

Los exosomas pueden desempeñar un papel relevante en el control o en el favorecimiento de enfermedades neurodegenerativas. Pueden promover o limitar la agregación de proteínas mal plegadas (como el β -amiloido) en el sistema nervioso central, ejerciendo funciones desintoxicantes y neuroprotectores; también pueden facilitar la expansión y agregación de proteínas Tau mal plegadas, lo que contribuye a la progresión de estas patologías (Budnik et al., 2016; Levy, 2017; Quek & Hill, 2017). La propagación patológica de Tau, proteína asociada a microtúbulos que estabiliza el citoesqueleto neuronal, se

suma a otras funciones atribuidas a los exosomas, como transportar antígenos proteicos derivados de infecciones virales o preparar nichos premetastásicos distantes del tumor primario, facilitando la metástasis (Becker et al., 2016). Se ha descrito, además, la presencia de ADN mitocondrial (ADNm_t) en exosomas de fibroblastos tumorales, capaz de inducir fosforilación oxidativa en células tumorales mamarias y de sacar de la latencia metabólica a células tumorales quiescentes en modelos murinos (Sansone et al., 2017). Asimismo, los exosomas promueven la angiogénesis tumoral, un paso crítico para el crecimiento y la diseminación metastásica (Kucharzewska et al., 2013; Zhou et al., 2014). Los exosomas liberados por tumores de mama pueden actuar como señuelos antigénicos para anticuerpos terapéuticos (anti-CD20, anti-HER2), reduciendo su eficacia frente a las células cancerosas (Ciravolo et al., 2012). Este efecto de señuelo lo hemos descrito también en enfermedad de Chagas (Díaz-Lozano et al., 2017): los exosomas forman inmunocomplejos, tras “sequestrar” anticuerpos con resultado de modular la enfermedad.

Además de favorecer nichos metastásicos, los exosomas derivados de cáncer colorrectal pueden promover quimiorresistencia al potenciar el crecimiento de células madre tumorales mediante transferencia horizontal de miARN y ARN largos no codificantes (lncRNA), lo que reducen la eficacia de los fármacos (Au Yeung et al., 2016; Binenbaum et al., 2018; Chen et al., 2014; Quet et al., 2016). Junto a estas funciones, los exosomas inmunomodulan de forma notable: presentan antígeno (MHC I/II), favorecen la activación Treg o inducen respuestas inflamatorias con producción de IFN- α , IFN- γ y TNF- α , facilitando la maduración de células dendríticas y la activación de linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ (Giri & Schorey, 2008; Wang et al., 2016).

El ADN contenido en exosomas liberados por bacterias intracelulares como *Listeria*, *Legionella pneumophila* y *Francisella tularensis* puede activar la señalización en células vecinas e inducir respuesta immune innata (Nandakumar et al., 2019). Asimismo, exosomas procedentes de macrófagos infectados por *Mycobacterium avium* transfieren componentes bacterianos a macrófagos no infectados y activan los Toll Like Receptors (TLR), desencadenando una respuesta proinflamatoria (Bhatnagar & Schorey, 2007). Probablemente, el equilibrio entre exosomas que activan células T/B y aquellos que

inhiben su función constituye un elemento clave en la patogénesis de múltiples enfermedades —cánceres, cardiovasculares y autoinmunes— (Schorey et al., 2015).

La presencia ubicua de EV en fluidos biológicos y el conocimiento de biomarcadores detectables permiten su uso como biomarcadores mediante biopsia líquida, con claras ventajas diagnósticas. La toma de muestra resulta mínimamente invasiva y pueden emplearse, además de sangre, orina, saliva o leche materna.

Como se indicó, la biogénesis exosomal permite la captura de una carga molecular extracelular e intracelular compleja que puede ser muy útil en las pruebas de diagnóstico multiparamétricas integrales. El conocimiento de las proteínas de superficie exosomal posibilita su captura y enriquecimiento para estudiar proteínas y ácidos nucleicos. Esta aproximación ha mostrado utilidad diagnóstica y pronóstica en tumores (hígado, mama, colon, páncreas, leucemias) (Salehi & Sharifi, 2018; Bernard et al., 2019; Thakur et al., 2014; Fitts et al., 2019), en enfermedades cardiovasculares (Jansen & Li, 2017; Zhang et al., 2017), en enfermedades infecciosas (p. ej., tuberculosis) o neurodegenerativas (Kanninen et al., 2016). Más recientemente se ha propuesto su uso en diagnósticos psiquiátricos: un estudio de agosto de 2025 sugiere que fragmentos de ADNmt libre y en exovesículas séricas podrían constituir marcadores de esquizofrenia (Ankeeta et al., 2025; *Neuropsychopharmacology* 50, doi:10.1038/s41386-025-02204-1).

En esta línea, nuestro grupo ha publicado métodos para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas crónica y postratamiento basados en la detección de ADN exosomal (ADNxo), evidenciando ADNg y ADNm del parásito incluso cuando la parasitemia resulta indetectable por métodos convencionales incluido por PCR (Lozano N. et al., 2023; 2024). Asimismo, para entornos con baja dotación instrumental, hemos puesto a punto técnicas inmunológicas que detectan proteínas específicas del parásito, en particular el péptido señal de MASP en exovesículas séricas de pacientes crónicos y de neonatos de madres afectadas, cuando los estudios confirmatorios de transmisión vertical no son concluyentes. Estos pacientes representan un reto sanitario en países sin transmisión vectorial o con transmisión controlada.

Otros usos de exovesículas en estudio incluyen su empleo como adyuvantes, portadores de antígenos vacunales, inmunomoduladores y vehículos de fármacos, dada su capacidad de atravesar barreras biológicas, incluida la hematoencefálica. Considerándose que los métodos de infiltración actualmente empleados en traumatología con suero del paciente, en realidad hacen su efecto como consecuencia del enriquecimiento en exovesículas provenientes de las células del plasma en las zonas inflamadas. Si bien el uso de exovesículas procedentes de células madre, que actualmente se le está intentando publicitar para revertir el envejecimiento de la piel, puede acarrear una serie de riesgos aun inexplorados.

La liberación de vesículas hoy clasificadas como ectosomas por formas no infectivas de *Trypanosoma cruzi* fue descrita por Franco da Silveira y colaboradores (Biochim. Biophys. Acta, 1979; 550:222-232). En un principio, muchos autores interpretaron este fenómeno como un mecanismo de renovación o “limpieza” de la membrana (similar al “shedding” o “capping” descritos en células linfoides y otros protozoos) para retirar anticuerpos unidos a la membrana.

Mediante microscopía electrónica, observamos la liberación de nanopartículas y optimizamos su purificación a partir de formas aisladas del parásito y de sus condiciones de cultivo. El procedimiento consistió en incubar las distintas formas durante un tiempo limitado, verificar su viabilidad para minimizar la presencia de cuerpos apoptóticos y aplicar un protocolo combinado de centrifugación diferencial, filtración (que deja pasar exosomas) y ultracentrifugación durante varias horas.

El “botón” obtenido mostró, por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y por microscopía de fuerza atómica (AFM), una población homogénea de vesículas de 80-120 nm: esféricas o en forma de copa en TEM, y o de “gota” en AFM. Los análisis de dispersión dinámica de luz (DLS) y de seguimiento de nanopartículas (NTA) confirmaron la homogeneidad global de las preparaciones y, a la vez, la presencia de subpoblaciones dentro de estas exovesículas. La inmunocitoquímica bajo TEM reveló proteínas MASP en superficie: ~46 % de las vesículas reaccionó con anticuerpos frente al péptido señal (oro colectivo), ~7 % con el péptido C-terminal y ninguna con anticuerpos dirigidos a las tetraspaninas, en concordancia con los inmunoblot previos. El control con

un anticuerpo comercial anti-clatrina (proteína asociada con exosomas) marcó ~30 % de los exosomas purificados. Estos hallazgos avalaron la pureza de las EVs de *T. cruzi*, y permitieron capturarlas en suero de pacientes para estudiar su contenido.

Mediante un ELISA de captura —inmovilizando anticuerpos contra el péptido señal de MASP—, en los sueros de pacientes crónicos con enfermedad de Chagas se capturaron exovesículas circulantes del parásito que portaban estas proteínas, sin ortólogos en otros parásitos ni en humanos. La carga fue similar entre grupos clínicos (~35-40 µg/mL, $\approx 1,5 \times 10^{11}$ EV/mL), con valores más altos en pacientes con sintomatología intestinal y más bajos en el grupo indeterminado (Díaz-Lozano et al., 2016). Estas EVs fueron reconocidas por antisueros anti-*T. cruzi* y por anti-CD9 (tetraspanina de mamífero), lo que sugiere un origen mixto: exovesículas procedentes de parásitos libres y/o de células hospedadoras infectadas con las formas amastigotes.

En los sueros de los pacientes, estas exovesículas forman inmunocomplejos y aparecen recubiertas de IgG, predominantemente IgG2 e IgG4 (Lozano N. et al., 2024). La disociación ácida de los complejos aumentó la señal frente al péptido señal, especialmente en pacientes con patología intestinal, lo que apunta a un posible marcador pronóstico de evolución digestiva.

Asimismo, mostramos que las EV actúan como señuelos antigenicos capaces de captar anticuerpos séricos, y que los exosomas de formas infectivas y de amastigotes intracelulares inhiben el complemento, con máxima inhibición en sueros de pacientes crónicos cardíacos (De Pablos et al., 2016; Díaz-Lozano et al., 2017). Este efecto coincide con trabajos previos en los que las formas infectivas bloquean la C3-convertasa del complemento; en concreto, se describió que la proteína Tc13 del secretoma se une a C3b y C3d e inhibe la enzima clave de la cascada (Cestari et al., 2012; Ramírez M.I., 2017).

El análisis proteómico de exosomas de formas no infectantes y de formas infectantes (Retana-Moreira L. et al., 2021) identificó 528 proteínas en los exosomas de triatomastigotes (infectivos) y 415 en los de epimastigotes (no infectivos). Entre las asociadas a infectividad/virulencia detectamos cruzipainá (GP57/51; cisteína-proteasa que interactúa con bradicinina y modula entradas de Ca²⁺), GP63 (metaloproteasa también presente en *Leishmania*),

fosfolipasas A₂ y D, MASP y un grupo amplio de trans-sialidasas ($\approx 22\%$ del proteoma, pertenecientes a las ocho familias descritas; Freitas et al., 2012). Las trans-sialidasas cumplen una doble función: como lectinas de anclaje a membranas con ácido siálico terminal cuando carecen de centro catalítico (familia II), y como enzimas transferasas (familia I) que transfieren ácido siálico a mucinas y otras glucoproteínas del parásito, aumentando su carga negativa. A diferencia de la neuraminidasa de influenza —que elimina el ácido siálico—, las trans-sialidasas lo transfieren a glicoproteínas que carecen de él. En exosomas de parásitos invasivos detectamos 121 trans-sialidasas (familias I–VIII), mientras que en EV de formas no infectivas hallamos 33, todas de familia II (no catalíticas). Estas enzimas presentan repeticiones de un péptido llamado SAPA, que favorecen el anclaje a membrana, inducen respuesta policlonal, resultando útiles en diagnóstico inmunológico.

Mediante Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) localizamos estas proteínas en la superficie de las exovesículas, igual que MASP; en cambio, la cisteína-proteasa cruzipaína se localiza en el interior de los exosomas (Prescilla-Ledezma et al., 2021).

¿Cómo entran estas exovesículas en las células? Los estudios por TEM con inmunohistoquímica mostraron que los exosomas del parásito contactan con la membrana plasmática y, en menos de un minuto, inducen en células no fagocíticas la formación de lámelas, que intentan englobarlos para luego fusionarse con la membrana. En otros casos, la exovesícula se adhiere, activa micropinocitosis, se fusiona y vierte su contenido al citosol. Estas rutas dependen de los ligandos presentes en la superficie de la exovesícula y receptores de la célula.

La entrada desencadena cambios fisiopatológicos que, en parte, reproducen lo que ocurre cuando el tripomastigote invade la célula (Retana-Moreira et al., 2019). Con dosis muy bajas ($\geq 0,38\text{ }\mu\text{g/mL}$), las exovesículas de formas infectivas alteran rápidamente la organización del citoesqueleto celular: a los 15 min observamos desorganización de actina y reagrupamiento de vimentina; a los 30 min aparecen proyecciones citoplasmáticas y se condensa un cinturón de actina en el borde celular. Estos cambios se acompañan de bloqueo del ciclo celular en G0–G1; aumento del Ca²⁺ citóslico por liberación desde la mitocondria y retículo endoplásmico y resistencia a la apoptosis inducida por taxol.

Cuando añadimos exovesículas junto con tripomastigotes, la parasitación aumenta. Los efectos son reversibles, altamente específicos (no se observan con EVs de células de mamífero, de otros tripanosomátidos ni con parásitos intracelulares como *Toxoplasma*), dependen de la temperatura y si se inactivan por tratamiento enzimático o por calor. De forma llamativa, esta interacción permeabiliza la membrana celular y la vuelve susceptible a la α -sarcina (toxina de *Aspergillus giganteus*) o a IgG: por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de 180 kDa que reconoce un epítopo (aa 340-413) del receptor β -adrenérgico, normalmente anclado al citosol, consigue atravesar la membrana. Este fenómeno podría contribuir a la generación de autoanticuerpos contra orgánulos intracelulares, rasgo característico de la patología chagásica.

En cuanto a la expresión génica, el análisis transcriptómico (Cornet Gómez et al., 2023) identificó 322 genes alterados: 168 sobreexpresados y 154 reprimidos. Destaca la activación de genes de ubiquitinación (Ube2C, SUMO1, SUMO2), de SRGAP3 (proteína que inhibe a CDC42, clave en remodelación del citoesqueleto) y de la kinasa CSNK1G1, que inhibe la apoptosis. Este efecto antiapoptótico se refuerza con la aparición del lncRNA HOXA-RNA2. Para el parásito, evitar la apoptosis es ventajoso, porque las formas intracelulares deben multiplicarse dentro de la célula; así, las exovesículas preparan el nicho para la parasitación intracelular de *T. cruzi*. Entre los genes reprimidos se incluyen componentes de las Rho-GTPasas (RhoA, Rac1, Cdc42), esenciales en señalización y citoesqueleto, y MALT1, cuya disminución bloquea NF- κ B, factor central en inflamación, maduración y supervivencia de células inmunes.

La descripción de macrófagos peritoneales de morfología y función distintas (grandes, LPM; y pequeños, SPM) en ratón (Ghosn E.E. y col.) mostró que, tras la inyección intraperitoneal de LPS o de formas de *T. cruzi*, la proporción cambia a favor de los SPM. Por otro lado, se sabe que la sialilación (presencia de ácido siálico) en la fracción Fc de las IgG modula la inflamación: durante el embarazo aumentan las IgG sialiladas y mejoran cuadros como la artritis de diferentes etiologías; de forma análoga, la administración de Fc sialilada reduce los procesos inflamatorios.

Con estos antecedentes y dado que en pacientes con tripanosomiasis americana circulan inmunocomplejos de IgG unidas a exovesículas del parásito,

planteamos una serie de experimentos: inoculamos en la cavidad peritoneal de ratones exosomas, inmunocomplejos formados con IgG anti-*T. cruzi* (sialiladas o no sialiladas, purificadas por cromatografía de afinidad) y, como controles, solución salina, formas de *T. cruzi* o LPS. El lavado peritoneal y la citometría de flujo mostraron que los LPM dominaban en ratones no estimulados, mientras que tras LPS, *T. cruzi* o inmunocomplejos, aumentaron los SPM, por el contrario, la inoculación de las EVs equilibraba las proporciones.

El análisis de interleucinas, reveló que, tras estimulación con exovesículas, los LPM producían principalmente IL-18, TNF- α , IFN- γ e IL-18 (perfil inflamatorio), mientras que los SPM mostraban una respuesta antiinflamatoria con IL-10, IL-15 y TGF- β . Sin embargo, cuando inoculamos inmunocomplejos con IgG no sialiladas (no moduladoras), los LPM produjeron niveles elevados de IL-18, IL-6, IL-18, IL-12, IFN- γ y TNF- α , un perfil compatible con el observado en pacientes crónicos con la enfermedad de Chagas (Cornet Gómez y col., 2024).

La inoculación intravenosa en ratón de exovesículas o de inmunocomplejos “inactivados” por calor, indujo en el bazo una respuesta más exacerbada, de tipo Th1/Th17, que la observada sin inactivación. Ello sugiere que algunos componentes de las exovesículas modulan la respuesta inmune del hospedador, atenuando la inflamación desencadenada por TLR4/TLR9 (cuyas activaciones dañan al parásito y reducen sus formas circulantes), quizás como consecuencia de los cambios de expresión de la MALT1 antes mencionada. Observamos migración de células GL7 $^+$ /CD95 $^+$ a centros germinales, junto a células FOXP3 $^+$, y aumento de células plasmáticas CD138 $^+$ en el estroma esplénico, especialmente con exovesículas inactivadas o con inmunocomplejos formados con ellas; este patrón favorecería la producción de autoanticuerpos.

A partir de estos datos, propusimos que las exovesículas o los inmunocomplejos, por su alta carga proteica y por los daños celulares que inducen, podrían ser los desencadenantes de autoanticuerpos, considerados por muchos como clave en el daño cardiaco (alteraciones del ritmo, bradicardia, miocarditis, dilatación de cavidades) de la enfermedad de Chagas. Para evaluarlo, inoculamos repetidamente por vía intravenosa (vena marginal de la cola) exovesículas del parásito o inmunocomplejos con dichas EV en distintos lotes de ratones.

Mediante electrocardiografía diaria durante 21 días, detectamos desde las primeras inoculaciones alteraciones del ritmo con disminución de la frecuencia cardiaca y prolongación del intervalo PR, acompañadas de un aumento sérico de BNP (péptido natriurético tipo B), especialmente cuando la inoculación se hizo con inmunocomplejos. Al finalizar, comprobamos dilatación de cavidades cardiacas (en particular del ventrículo derecho) y adelgazamiento de la pared ventricular y del tabique interventricular. No detectamos autoanticuerpos frente a proteínas del miocardio ni frente a receptores β -adrenérgicos, como se ha descrito en la cardiopatía chagásica; sí bien si aparecieron anticuerpos contra membranas del parásito y contra sus exovesículas (Cornet Gómez y col., 2025).

En tejido cardíaco, los niveles de citocinas mostraron un perfil Th1 con elevación de IL-18, IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α y óxido nítrico, junto a una respuesta compensatoria con IL-15, TGF- β e IL-10. En paralelo, observamos una marcada reducción de conexina-43 (proteína de las uniones gap que facilita el paso de iones/ATP y la conductividad eléctrica cardíaca, producida por macrófagos intracardiacos; Hulsmans y col., 2017) y una disminución de VCAM-1, implicada en adhesión celular y recientemente propuesta como marcador de cardiopatía chagásica crónica (Vaitkevicius-Antão V. y col., 2025). Estos últimos resultados han sido publicados por nuestro grupo en este presente año (Cornet Gómez y col., 2025).

En conjunto, los datos postulan que los inmunocomplejos formados por exosomas de formas infectantes y IgG del hospedador no solo favorecen la parasitación y reprograman a las células (fisiológica, bioquímica e inmunológicamente) para facilitar el establecimiento del parásito, sino que, a través de la región Fc de las IgG, interactúan con receptores Fc γ R en membranas de macrófagos intracardiacos y otras células, opsonizan de forma “engañosamente” y aceleran el daño celular a medida que las EVs se internalizan.

La posible participación de receptores Fc γ R en macrófagos intracardiacos y cardiomiositos, en diálogo con las exovesículas, abre la puerta a estrategias terapéuticas dirigidas a modular o bloquear dichos receptores para “interferir la facilitación del contacto EVs /Célula”, en definitiva, la opsonización y mitigar el daño cardíaco en la enfermedad de Chagas.

Todo ello confirma la sutil manipulación que ejercen los parásitos para engañar y persistir en el hospedador, mediante sutiles mensajes mediante Exovesículas a las células que les facilitan su entrada y supervivencia pero que son los responsables del daño y reprogramación de las mismas.

He dicho.

Referencias

- Adroher F.J., Lupiañez J.A., Osuna A. Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation fo *Trypanosoma cruzi*.: Cell Differentiation, 22:165-170. 1988.
- Adroher F.J., Osuna A., Lupiañez J.A. Phloretin and citrate promote the differentiation rate from epimastigote to metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* : Acta Trópica 50:79-85. 1991
- Adroher FJ, Osuna A, Lupiáñez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. Mol Cell Biochem. 1990 Apr 18;94(1):71-82. doi: 10.1007/BF00223564
- Adroher F.J., Osuna A., Lupiañez J.A., Fructose 1,6-bisphosphatase activity in two *Trypanosoma cruzi* morphological forms. J. Parasitol, 73(2):438-441. 1987.
- 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>
- Alberto Cornet-Gomez; Lissette R. Moreira; Mercedes GomezSamblás; **Antonio Osuna**. 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 immunomodulatory responses. Front. Immunol. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1215913
- Alcalde E., Maños L., Valls N., Elguero J., Osuna A., Ruiz L.M. 5-Nitroimidazoles as chemotherapeutic agents: Synthesis and biological activity. Acta Pharmaceutica Suecia 2:88-90. 1983.

- Ana K Ibarrola-Vannucci 1,2,3; Luis M De Pablos1; Lissette Retana-Moreira 1,4; Alberto Cornet-Gómez1;Teresa Cruz-Bustos1,5; Ajejandro G Schijman6; Jose L Ramírez7, Susana Vilchez1,8; Antonio Osuna. Characterization and functional analysis of the proteins Prohibitin 1 and 2 in *Trypanosoma cruzi*, 2021. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15(4): e0009322. doi.org/10.1371/journal.pntd.0009322
- Ankeeta A, Tripathi A, Pillai B, Ma Y, Chiappelli JJ, Jernberg JN, Kunitoki K, Du X, Gao S, Adhikari BM, Walss-Bass C, Scaini G, Kochunov P, Pillai A, Hong LE. Blood and neuronal extracellular vesicle mitochondrial disruptions in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2025 Nov;50(12):1836-1844. doi: 10.1038/s41386-025-02204-1.
- Barteneva NS, Fasler-Kan E, Bernimoulin M, Stern JN, Ponomarev ED, Duckett L, Vorobjev IA. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol*. 2013 Apr 22;14:23. doi: 10.1186/1471-2121-14-23
- Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel)*. 2020 Jan 20;9(1):21. doi: 10.3390/biology9010021.
- Becker A, Thakur BK, Weiss JM, Kim HS, Peinado H, Lyden D. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell*. 2016 Dec 12;30(6):836-848. doi: 10.1016/j.ccr.2016.10.009.
- Bhatnagar S, Schorey JS. Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem*. 2007 Aug 31;282(35):25779-89. doi: 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. Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2018 Sep 15;78(18):5287-5299. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0124.

- Budnik V, Ruiz-Cañada C, Wendler F. Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Mar;17(3):160-72. doi: 10.1038/nrn.2015.29
- Castaño C, Meza-Ramos A, Batlle M, Guasch E, Novials A, Párrizas M. Treatment with EV-miRNAs Alleviates Obesity-Associated Metabolic Dysfunction in Mice. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 29;23(23):14920. doi: 10.3390/ijms232314920.
- Castany S, Gamarro F, Ruiz-Pérez LM, Osuna A. Purification of a glycoprotein excreted by *Trypanosoma cruzi* to increase the permeability of the host-cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Jan 30;166(2):736-42. doi: 10.1016/0006-291X(90)90871-j
- Castany S., Osuna A., Gamarro F., Ruiz L.M. Purification of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* by Percoll discontinuous gradient centrifugation. *Z. Parasitenkd.* 70:443-449. 1984.
- 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. *Nova tripanossomiase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do Schizo-trypanum cruzi n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem.* *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159-218.
- 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>
- Comparative cytotoxicity of secondary hydatid cysts, protoscoleces, and “in vitro” developed microcysts of *Echinococcus granulosus*. *Journal of Helminthology* 66:124-131. 1992.
- Cornet-Gomez A, O'Valle F, Garrido JM, Serrano FR, Nieto AI, Osuna A. Cardiac alterations induced by *Trypanosoma cruzi* extracellular vesicles and immune complexes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2025 Jul 7;19(7):e0013273. doi: 10.1371/journal.pntd.0013273.

- 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* 13, 7618 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34820-6>
- 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>
- De Rycke P.H., Janssen D., Gamarro F., Osuna A.: Lethal effects of *Echinococcus granulosus* cyst fluid on mouse macrophages. *Biol. Jb. Dodonaea* 53:169-176. 1985.
- De Rycke P.H., Janssen D., Osuna A., Lazúen J. The immunohomeostatic role of hydatid cyst toxins (*Echinococcus granulosus*). *Parasitologia* 33:55-60. 1991.
- Deng ZB, Poliakov A, Hardy RW, Clements R, Liu C, Liu Y, Wang J, Xiang X, Zhang S, Zhuang X, Shah SV, Sun D, Michalek S, Grizzle WE, Garvey T, Mobley J, Zhang HG. Adipose tissue exosome-like vesicles mediate activation of macrophage-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2009 Nov;58(11):2498-505. doi: 10.2337/db09-0216
- Ekström, E. J., Bergenfelz, C., von Bülow, V., Serifler, F., Carlénalm, 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. 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>
- 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>

- 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>
- 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. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025914>
- Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J.-C., & Schifferli, J. ür. 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)
- Giovannangeli G., Osuna A., Ruiz L.M., Soyfer J.C., Galy J.P., Barbe J. 9-thio-1,2,3,4-tetrahydroacridines as trypanocidal drugs. *Acta Pharmaceutica* 2:94-95. 1985.
- Giri PK, Schorey JS. Exosomes derived from *M. Bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2008 Jun 18;3(6):e2461. doi: 10.1371/journal.pone.0002461.
- Guay C, Regazzi R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk. *Diabetes Obes Metab*. 2017 Sep;19 Suppl 1:137-146. doi: 10.1111/dom.13027.
- Gurunathan S, Kang MH, Qasim M, Khan K, Kim JH. Biogenesis, Membrane Trafficking, Functions, and Next Generation Nanotherapeutics Medicine of Extracellular Vesicles. *Int J Nanomedicine*. 2021 May 18;16:3357-3383. doi: 10.2147/IJN.S310357.
- Han QF, Li WJ, Hu KS, Gao J, Zhai WL, Yang JH, Zhang SJ. Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Mol Cancer*. 2022 Nov 1;21(1):207. doi: 10.1186/s12943-022-01671-0.
- 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>
- Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, Hucker WJ, Wulfers EM, Seemann G, Courties G, Iwamoto Y, Sun Y, Savol AJ, Sager

- HB, Lavine KJ, Fishbein GA, Capen DE, Da Silva N, Miquerol L, Wakimoto H, Seidman CE, Seidman JG, Sadreyev RI, Naxerova K, Mitchell RN, Brown D, Liby P, Weissleder R, Swirski FK, Kohl P, Vinegoni C, Milan DJ, Ellinor PT, Nahrendorf M. Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell.* 2017 Apr 20;169(3):510-522.e20. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.050.
- Isabel María Díaz Lozano, Luis Miguel De Pablos, Silvia Andrea Longhi, María Paola Zago, Alejandro Gabriel Schijman and Antonio Osuna. Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region: www.nature.com/scientificreports 2017 | 7:44451 | DOI: 10.1038/srep44451
- 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
- Janssen D., De Rycke P.H., Osuna A. Dose-dependent effects of hydatid fluid toxins from *Echinococcus granulosus* on mouse peritoneal macrophages. *Folia Parasitology.* 41:109-113. 1993.
- Janssen D., De Rycke P.H., Osuna A., Lazúen J. Role of receptor-mediated endocytosis in the effector mechanism of larval *Echinococcus granulosus* cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 9:191-199. 1990.
- Janssen D., Osuna A., Lazúen J., De Rycke P.H. Comparative cytotoxicity of secondary hydatid cysts, protoscoleces, and “in vitro” developed microcysts of *Echinococcus granulosus*. *Journal of Helminthology* 66:124-131. 1992.
- Janssen D., Rueda M.C., De Rycke P.H., Osuna A. Immunomodulation by hydatid cyst fluid toxin (*Echinococcus granulosus*). *Parasite Immunology.* 19:149-160.1997.
- Janssen D., Sbihi J., Rueda M., Osuna A., De Rycke P.H. The adhesion of mouse leukocytes to protoscoleces (*Echinococcus granulosus*) in vitro. *Med. J. infec. and Parasitic Diseases.* Vol. 10(4):203-206. 1995.
- Jimenez A., Guevara D.C., Osuna A., Alonso C. *Trypanosoma cruzi* induces changes in the nucleic acids content of host HeLa cells “in vitro”. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* (6):573-581. 1984.
- 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>

- Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. doi: 10.1126/science. aau6977.
- Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016 Feb 6;17(2):170. doi: 10.3390/ijms17020170
- 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.bbadi.2015.09.020>
- 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>
- 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>
- 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>
- L.M Pablos, Retana L. Osuna A. Extracellular vesicles in Chagas disease: a new passenger for an old disease. *Frontiers in Microbiology* 2018 Jun 1;9:1190. doi: 10.3389/fmicb.2018.01190. eCollection 2018
- Lissette Retana Moreira, Fernando Rodríguez Serrano, Antonio Osuna. Extracellular vesicles of Trypanosoma cruzi tissue-culture cell-derived

trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. Plos Neglected Tropical Diseases 2019 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>

Lissette Retana Moreira, Alexa Prescilla-Ledezma, Alberto Cornet-Gomez , Fátima Linares, Ana Belén Jódar-Reyes , Jorge Fernandez , Ana Karina Ibarrola Vannucci Luis Miguel de Pablos and Antonio Osuna. Biophysical and biochemical comparison of extracellular vesicles produced by infective and non-infective stages of *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22(10), 5183; <https://doi.org/10.3390/ijms22105183>

Liu AR, Yan ZW, Jiang LY, Lv Z, Li YK, Wang BG. The role of non-coding RNA in the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori*-related gastric cancer, with a focus on inflammation and immune response. Front Med (Lausanne). 2022 Oct 13;9:1009021. doi: 10.3389/fmed.2022.1009021.

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>

Lozano N, Alexa Prescilla-Ledezma, Eva Calabuig, Maria Treliis, José Miguel Sahuquillo Arce, José Luis López Hontangas, Luis Miguel de Pablos, Mercedes Gomez-Samblas and **Osuna A**.2023 Circulating Exovesicles in Sera of Chronic Patients as a Method for Determining Active Parasitism in Chagas Disease. PLOS Neglected Tropical Diseases. Nov 20;18(11):e0012356. doi: 10.1371/journal.pntd.0012356.

Lozano N, Prescilla-Ledezma A, Calabuig E, Treliis M, Arce JMS, López Hontangas JL, de Pablos LM, Gomez-Samblas M, Osuna A. Circulating extracellular vesicles in sera of chronic patients as a method for determining active parasitism in Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2024 Nov 20;18(11):e0012356. doi: 10.1371/journal.pntd.0012356.

Luis M. De Pablos, and Antonio Osuna*. Multigene families in Trypanosoma cruzi and their role in infectivity Infection and Immunity: 2012, 80(7):2258-2264

Luis M. De Pablos, Gloria González González, Jennifer Solano Parada, Víctor Seco Hidalgo, Isabel M. Díaz Lozano, María M. Gómez Samblás, Teresa Cruz

Bustos and Antonio Osuna*. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface proteins (MASP) family secreted by *Trypanosoma cruzi* Infection and Immunity 2011, 79 (10). 3993-4001

Luis Miguel De Pablos, Isabel María Díaz Lozano, Maria Isabel Jercic, Markela Quizada, Maria José Giménez, Calabuig E, Ana Margarita Espino, Alejandro Gabriel Schijman, Inés Zulantay, Werner Apt, Antonio Osuna. The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASP proteins is antigenic and secreted via exovesicles. [www.nature.com/scientificreports:](http://www.nature.com/scientificreports/) 6:27293 DOI: 10.1038/srep27293

Luis Miguel De Pablos, Isabel María Díaz Lozano, Maria Isabel Jercic, Markela Quizada, Maria José Giménez, Calabuig E, Ana Margarita Espino, Alejandro Gabriel Schijman, Inés Zulantay, Werner Apt, Antonio Osuna. The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASP proteins is antigenic and secreted via exovesicles. [www.nature.com/scientificreports:](http://www.nature.com/scientificreports/) 6:27293 DOI: 10.1038/srep27293

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>

Marleau, A.M., Chen, CS., Joyce, J.A. et al. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* 10, 134 (2012). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-134>

Mascaró M.L., Mascaró C., Osuna A., Perez M.I., Gonzalez J. Study of an Amoeboflagellate isolated from the nasal mucosa of man.: J. Protozool. 33(1):89-93. 1986. Mascaró C., Fluvia C., Osuna A., Guevara D. Virulent Naegleria sp. Isolated from a River in Cádiz (Spain). J. Parasitol. 67(4):599. 1981.

MAZZA, S. & JÓRG, M. E. Anatomía patológica de la enfermedad de Chagas y de animales naturalmente infectados por *Schizouypanum cruzi*. Acwalidad Médica Mundial, X: 277, 1940.

- Mester B., Elguero J., Claramunt R.M., Castany S., Mascaró M.L., Osuna A., Vilaplana M.J., Molina P. Activity against *Trypanosoma cruzi* of new analogues of Nifurtimox. Arch. Pharm. 320:115-120. 1987.
- Mezouar S., Darbousset R., Dignat-George F., Panicot-Dubois L., Dubois C. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis in vivo. Int J Cancer. 2015 Jan 15;136(2):462-75. doi: 10.1002/ijc.28997
- Montecalvo A., Larregina AT., Shufesky WJ., Stoltz DB., Sullivan ML., Karlsson JM., Baty CJ., Gibson GA., Erdos G., Wang Z., Milosevic J., Tkacheva OA., Divito SJ., Jordan R., Lyons-Weiler J., Watkins SC., Morelli AE. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. Blood. 2012 Jan 19;119(3):756-66. doi: 10.1182/blood-2011-02-338004.
- 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., Tschismarov R., Meissner F., Prabakaran T., Krissanaprasit A., Farahani E., Zhang BC., Assil S., Martin A., Bertrams W., Holm CK., Ablasser A., Klause T., Thomsen MK., Schmeck B., Howard KA., Henry T., Gothelf KV., Decker T., Paludan SR. Intracellular bacteria engage a STING-TBK1-MVB12b pathway to enable paracrine cGAS-STING signalling. Nat Microbiol. 2019 Apr;4(4):701-713. doi: 10.1038/s41564-019-0367-z.
- Orrego LM., Romero R., Osuna A., De Pablos LM. Methods for the Isolation and Study of Exovesicle DNA from Trypanosomatid Parasites. Methods Mol Biol. 2021;2369:301-317. doi: 10.1007/978-1-0716-1681-9_16. PMID: 34313995.
- Osuna A., Adroher F.J., Lupiáñez J.A. Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Differentiation and Develop. 30:89-95. 1990.
- Osuna A., Castany S., Mascaró C., Adroher F.J., Braña M.F., Roldan C.M. "in vitro" action of three benzo (de) isoquinoline-1,3-dione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 25(5):254-258. 1983.

- Osuna A., Castanys S., Ortega G., Gamarro F., Aneiros J., Braña M.F., Roldan C.M. Estudio ultraestructural de la acción de dos derivados benzo (de) isoquinolil-1,3-diona sobre *Trypanosoma cruzi* “in vitro”. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 25(3):133-138. 1983.
- Osuna A., Castanys S., Rodriguez M.N., Gamarro F. *Trypanosoma cruzi*: calcium ion movement during internalization in host HeLa cells.: Inter. J Parasitol. 20(5):673-676. 1990.
- Osuna A., Gamarro F., Castanys S., Ruiz L.M. Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. Inter. Jour. Parasitol. 16(6):629-632. 1986.
- Osuna A., Gamarro F., Castanys S., Ruiz L.M. Resistance to Reinfection of HeLa cells parasitized by *Trypanosoma cruzi*. : J. Parasitol. 70(5):825-826. 1984.
- Osuna A., Gamarro F., Janssen D., Carreras M.A., Castanys S., Adroher F.J., de Rycke P.H. Cytotoxicity of *Echinococcus granulosus* hydatid fluid: species specific activity and initial biochemical characterisation. Rev. Iber. Parasitol. 47:47-52. 1987.
- Osuna A., Jiménez-Ortiz A., Lozano-Maldonado J. Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Iber. Parasitol. Vol. 39:129-133. 1979.
- Osuna A., Jiménez-Ortiz A., Mascaró C., Alonso C. *Trypanosoma cruzi*: arrested Division of amastigote forms in Enucleated HeLa cells. J. Parasitol. 69(3):629-631. 1983.
- Osuna A., Ortega G., Gamarro F., Castanys S., Ruiz L.M. Effect of interferon on the infectivity of *Trypanosoma cruzi* in cultured HeLa cells. Inter. J. Parasitol. 15(2):167-170. 1985.
- Osuna A., Rodriguez J.I., Ruiz L.M., Gamarro F., Castanys S., Giovannangeli G., Galy A.M., Galy J.P., Soyfer J., Barbe J. Antamebic activity of New acridinic derivatives against *Naegleria* and *Acanthamoeba* species “in vitro”. Chermotherapy 33:18-21. 1987.
- Osuna A., Rodriguez M.N., Castanys S., Mesa C., Mascaró C. A protein secreted by *Trypanosoma cruzi* capable of inducing the entry of inert particles into HeLa cells. Intern. Journ. Parasitol. 25(10):1213-1225.1995.

- Osuna A., Rodriguez N., Boy M., Castanys S., Gamarro F. The invasion mechanism of the metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in nonphagocytic host cells. Biol. Res. 26:19-26. 1993.
- Osuna A., Rodriguez N., Gamarro F., Mascaró C. The different behaviour of Diphtheria toxin, modeccin and ricin in HeLa cells infected with *Trypanosoma cruzi*. : J. Euk. Microbiol. 41(3):231-239. 1994.
- Osuna-Carrillo A, Mascaró-Lazcano MC. The in vitro cultivation of *Taenia pisiformis* to sexually mature adults. Z Parasitenkd. 1982;67(1):67-71. doi: 10.1007/BF00929515.
- Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. Cell. 1983 Jul;33(3):967-78. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- 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)
- Parton RG, McMahon KA, Wu Y. Caveolae: Formation, dynamics, and function. Curr Opin Cell Biol. 2020 Aug;65:8-16. doi: 10.1016/j.ceb.2020.02.001.
- 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.; Linares, F.; Ortega-Muñoz, M.; Retana Moreira, L.; Jódar-Reyes, A.B.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F.; Osuna, A. Molecular Recognition of Surface Trans-Sialidases in Extracellular Vesicles of the Parasite *Trypanosoma cruzi* Using Atomic Force Microscopy (AFM). Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 7193. <https://doi.org/10.3390/ijms23137193>
- Quek C, Hill AF. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Feb 19;483(4):1178-1186. doi: 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>
- Rueda M.C., Osuna A., De Rycke P.H., Janssen D. Changes in T-Cell subpopulations in Mice during prolonged experimental secondary infection with *Echinococcus granulosus*. *Bioscience Reports*, 15(4):201-207. 1995.
- Ruiz L.M., Osuna A., Castanys S., Gamarro F., Craciunescu D., Doadrio A. Evaluation of the Toxicity of Rh(III) and Pt(II) complexes against *Trypanosoma cruzi* culture forms. *Arzneim-Forsch/drug Res.* 36(1):13-16. 1986.
- Ruiz L.M., Osuna A., López M.C., Castanys S., Gamarro F., Craciunescu D., Alonso C. Mode of action intercalating drug, cis-Pt (II)(DDH) Cl₂, cis-Pt (II) (DDH) (metafluorobenzoic)₂, and cis-Pt (II) (mucubromic)₂, on *Trypanosoma cruzi*. *Trop. Med. Parasit.* 38:45-48. 1987.
- 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>
- Sanchez Moreno M., Fernandez C., Castilla J.J., Osuna A. Metabolic studies by NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by "in vitro" culture.: FEEMS. *Microbiol. Letters*.133:119-125. 1995.
- Sanderson RD, Elkin M, Rapraeger AC, Ilan N, Vlodavsky I. Heparanase regulation of cancer, autophagy and inflammation: new mechanisms and targets for therapy. *FEBS J.* 2017 Jan;284(1):42-55. doi: 10.1111/febs.13932.
- Sansone, P., Savini, C., Kurelac, y col. (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

- Sbihi Y., Janssen D., Castilla J.J., Cadi Soussi M., Osuna A. *Echinococcus granulosus*: caractérisation des immunocomplexes circulants chez des patients avec l'hydatidose par SDS-PAGE et IEF. Med. J. Infec. Parasis. Dis. 8(3):182-183. 1993.
- Schöneberg J, Lee IH, Iwasa JH, Hurley JH. Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Jan;18(1):5-17. doi: 10.1038/nrm.2016.121.
- Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. EMBO Rep. 2015 Jan;16(1):24-43. doi: 10.15252/embr.201439363
- Srikanthan S, Li W, Silverstein RL, McIntyre TM. Exosome polyubiquitin inhibits platelet activation, downregulates CD36 and inhibits pro-atherothrombotic cellular functions. J Thromb Haemost. 2014 Nov;12(11):1906-17. doi: 10.1111/jth.12712
- Teresa Cruz Bustos; Ana Karina Ibarrola Vannucci; Isabel M Diaz Lozano; Jose Luis Ramirez; Antonio Osuna, Characterization and functionality of two members of the SPFH protein superfamily, prohibitin 1 and 2 in Leishmania major Parasites & Vectors 2018-12 | journal-article doi: 10.1186/s13071-018-3195-8
- 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, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, et al. . 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. J Extracell Vesicles. 2018 Nov 23;7(1):1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- Trabanelli S, Akselrod M, Fellrath J, Vanoni G, Bertoni T, Serino S, Papadopoulou G, Born M, Girondini M, Ercolano G, Ellena G, Cornu A, Mastria G, Gallart-Ayala H, Ivanisevic J, Grivaz P, Paladino MP, Jandus

- C, Serino A. Neural anticipation of virtual infection triggers an immune response. *Nat Neurosci.* 2025 Sep;28(9):1968-1977. doi: 10.1038/s41593-025-02008-y.
- van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul;64(3):676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983.
- van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 2012 Jul;64(3):676-705. doi: 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>
- Vaitkevicius-Antão V, Silva BA, Barros MDS, da Costa-Oliveira CN, Torreão BC, da Silva AC, Martins SM, Carrazone C, Oliveira W, Medeiros CA, Rabello MCDS, de Lorena VMB. Profile of soluble cell adhesion molecules as potential biomarkers in the cardiac stages of chronic Chagas disease. *Front Immunol.* 2025 Mar 7;16:1541860. doi: 10.3389/fimmu.2025.1541860.
- Wang J, Deng Z, Wang Z, Wu J, Gu T, Jiang Y, Li G. MicroRNA-155 in exosomes secreted from helicobacter pylori infection macrophages immunomodulates inflammatory response. *Am J Transl Res.* 2016 Sep 15;8(9):3700-3709.
- 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>
- Xavier CPR, Belisario DC, Rebelo R, Assaraf YG, Giovannetti E, Kopecka J, Vasconcelos MH. The role of extracellular vesicles in the transfer of drug resistance competences to cancer cells. *Drug Resist Updat.* 2022 May;62:100833. doi: 10.1016/j.drup.2022.100833.
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. -M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F., 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>
- YF Zhang, JB Shi, C Li Small extracellular vesicle loading systems in cancer therapy: Current status and the way forward - Cytotherapy, 2019
- Yousafzai NA, Wang H, Wang Z, Zhu Y, Zhu L, Jin H, Wang X. Exosome mediated multidrug resistance in cancer. *Am J Cancer Res.* 2018 Nov 1;8(11):2210-2226.
- Yuan Zhang, Yan-Wei Hu, Lei Zheng, and Qian Wang. 2017. Characteristics and Roles of Exosomes in Cardiovascular Disease. *DNA and Cell Biology.* // doi.org/10.1089/dna.2016.349
- Zhou W, Fong MY, Min Y, Somlo G, Liu L, Palomares MR, Yu Y, Chow A, O'Connor ST, Chin AR, Yen Y, Wang Y, Marcusson EG, Chu P, Wu J, Wu X, Li AX, Li Z, Gao H, Ren X, Boldin MP, Lin PC, Wang SE. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell.* 2014 Apr 14;25(4):501-15. doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.007.

