

Universidad  
Nacional  
de San Martín

**Estudio de la biogénesis de las vesículas  
extracelulares liberadas por *Trichomonas  
vaginalis* y su rol en el proceso de adherencia a  
células prostáticas y en la comunicación celular**

**Nehuén Salas**

**Directora: Dra. Natalia de Miguel**

**Co-directora: Dra. Verónica M. Coceres**

Trabajo de tesis doctoral para optar al título de Doctor en Biología  
Molecular y Biotecnología 2023

Laboratorio de Parásitos Anaerobios (LPA)  
Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de  
Chascomús  
-IIB-INTECH

Nehuén Salas

Dra. Natalia de Miguel

Dra. Verónica Coceres

# Agradecimientos

Gracias mamá y papá porque este trabajo lleva mucho esfuerzo y acompañamiento de su parte, como así también a mis abuelas; porque no es necesario una pipeta para que el trabajo de más de 5 años se vea reflejado en una tesis. Nunca me van a alcanzar las palabras para agradecerles.

Gracias Vani, porque todo este trabajo se facilitó por tu ayuda y tu acompañamiento a lo largo de muchos años y vivencias. Me ayudaste fuera y dentro de la tesis, lo que tiene un valor enorme y nunca voy a olvidar todo ese amor que pusiste en ayudarme y acompañarme.

Gracias a toda la familia, porque siempre se interesaron en mí y en como todo esto iba avanzando.

Aunque no pueden leer, un párrafo aparte va para mis mascotas, esa compañía incondicional de todos los días en todos estos años.

Gracias Vero, aunque no puede ir tu nombre sólo, siempre va con Beto y las nenas, porque me abrieron las puertas para vivir una hermosa amistad. Los quiero y los voy a extrañar.

Gracias Nati, aprendí muchas cosas de vos y me llevo mucho más que conocimientos, me llevo formas de ver este trabajo y herramientas necesarias para seguir.

Gracias a mis compañeros del labo, desde los más viejos (o que ya no están acá) como Aye, Lucre y el Tincho; hasta los más nuevos como Manu, Dani y Cris. Aye y Lucre me ayudaron en mi comienzos y Manu en el final, todo eso lo valoro enormemente.

Gracias a los amigos que estuvieron en estos tiempos, ya sea un pádel (vamos por otro título Pablito) o un asado. El Tincho y Cris, son un reflejo de que un vínculo laboral, puede convertirse en una gran amistad, gracias por eso.

Y no quiero dejar de agradecer a todo el INTECH, que me abrió las puertas y me dio todas las posibilidades de poder hacer todo este trabajo. Especialmente a mis compas doctorandos, porque siempre se sintió una solidaridad especial.

Los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

**2023. Nehuén Salas**, Manuela Blasco Pedreros, Tuanne dos Santos Melo, Vanina G. Maguire, Jihui Sha, James A. Wohlschlegel, Antonio Pereira-Neves, Natalia de Miguel. "Role of cytoneme-like structures and extracellular vesicles in *Trichomonas vaginalis* parasite: parasite communication". **eLife**. doi: 10.7554/eLife.86067.

Trabajo destacado como "Biomedical Picture of the Day" por el MRC London Institute of Medical Sciences (<http://www.bpod.mrc.ac.uk/archive/2023/5/13#.ZGIz1IzkwKs.twitter>) y seleccionado por la revista *Elife* como "Insight" (solo 15% de los artículos publicados son seleccionados).

**2022. Nehuén Salas**, Verónica M. Coceres, Tuanne dos Santos Melo, Antonio Pereira-Neves, Vanina G. Maguire, Tania M. Rodríguez, Bruna Sabatke, Marcel I. Ramirez, Jihui Sha, James A. Wohlschlegel, Natalia de Miguel. "VPS32, a member of the ESCRT complex, modulates adherence to host cells in the parasite *Trichomonas vaginalis* by affecting biogenesis and cargo sorting of released extracellular vesicles". **Cellular and Molecular Life Sciences**; 79:11 doi: 10.1007/s00018-021-04083-3.

**2020.** Yesica Romina Nievas, Ayelén Lizarraga, **Nehuén Salas**, Verónica M. Cóceres, Natalia de Miguel. "Extracellular vesicles released by anaerobic protozoan parasites: Current situation". **Cellular Microbiology**, 22(11) doi: 10.1111/cmi.13257.

# Abreviaturas

**°C:** grados Celsius

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AF:** flagelos anteriores

**ANOVA:** análisis de varianza

**APVs:** vacuolas periféricas acidificadas

**ARN:** ácido ribonucleico

**Ax:** axostilo

**BLAST:** herramienta de búsqueda de alineamiento local básico

**BPH-1:** células benignas de hiperplasia prostática

**BSA:** seroalbúmina bovina

**BspA:** proteína A de superficie de bacteroides

**Ca<sup>2+</sup>:** ion calcio

**CAM:** marcadores de adherencia celular

**CFSE:** éster succinimidílico de carboxifluoresceína

**CLP:** proteína tipo cadherina

**cm:** centímetros

**CMVs:** cuerpos multivesiculares

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**DAPI:** 4',6'-diamidino-2-fenilindol

**DE:** desvío estándar

**DMEM:** medio Eagle modificado Dulbecco

**EASs:** estructuras extra-asomales

**Ect-1:** células humanas ectocervicales

**EIVs:** vesículas similares a exosomas de Giardia

**ESCRT:** complejo endosomal requerido para el transporte

**ESCRTIII:** complejo endosomal requerido para el transporte, subunidad III

**F:** flagelo

**FITC:** fluoróforo isotiocianato de fluoresceína

**GO:** ontología de genes

**GVMP:** proteína de membrana similar a VSP de Giardia

**HA:** hemaglutinina

**HD-PTP:** enzima fosfotirosina fosfatasa de dominio histidina

**HeLa:** células de adenocarcinoma cervical

**Hmp33:** proteína transmembrana heptahelicoidal 3

**HS:** heparán sulfato

**HSV-II:** virus del herpes simple II

**IL6:** interleuquina 6

**IL8:** interleuquina 8

**ILVs:** vacuolas intraluminales

**IVSA:** antígeno de superficie variable inmunodominante

**LC-MS/MS:** cromatografía líquida/espectrometría de masas

**LDH:** lactato deshidrogenasa

**LFQ:** cuantificación libre de marcado

**LG:** lipoglicano

**LLF:** familia de lectinas similares a las leguminosas

**IVes:** vesículas extracelulares grandes

**MA:** metaloproteasas

**MEB:** microscopía electrónica de barrido

**MEC:** matriz extracelular

**MET:** microscopía electrónica de transmisión

**MIF:** factor inhibidor de la migración de macrófagos

**min:** minutos

**MinDet:** modelo mínimo determinista

**ml:** mililitro

**MVs:** microvesículas

**n/a:** no asignado

**NBT/BCIP:** cloruro de nitroazul de tetrazolio/sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

**Neo:** neomicina fosfotransferasa

**NHPrE1:** células epiteliales prostáticas humanas normales inmortalizadas

**nm:** nanómetros

**NTA:** análisis por seguimiento de nanopartículas

**OMVs:** vesículas de la membrana externa

**OsO<sub>4</sub>:** tetróxido de osmio

**p/p:** relación masa/volumen

**p/v:** relación masa/volumen

**PAF:** paraformaldehido

**PBS:** buffer fosfato salino

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PMP:** proteínas de membrana polimórfica de Chlamydia

**PSA:** análisis de componentes principales

**Rab:** proteínas GTPasas de la superfamilia Ras

**RF:** flagelos recurrentes

**RPMI:** medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

**SB:** subtilisina

**SC:** serina proteasa

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato

**SFB:** suero fetal bovino

**SFE:** suero fetal equino

**sVEs:** vesículas extracelulares pequeñas

**tARN:** ácido ribonucleico de transferencia

**TBS-T:** buffer salino TRIS-Tween

**TCTP:** proteína tumoral controlada traduccionalmente

**TEs:** elementos transponibles

**tsARN:** ácido ribonucleico de tamaño pequeño específico del tipo

**TSP1:** tetraspanina 1

**TSP6:** tetraspanina 6

**TSP8:** tetraspanina 8

**T-test:** prueba t de Student

**TSP8:** proteína tetraspanina 8

**TSP6:** proteína tetraspanina 6

**TSP1:** proteína tetraspanina 1

**TYM:** triptosa, extracto de levadura y maltosa

**VECs:** células vaginales epiteliales

**VEs:** vesículas extracelulares

**VIH:** virus de inmunodeficiencia humana

**VPS:** proteína vacuolar asociada a la clasificación

**WGA:** lectina aglutinina del germen de trigo

**$\alpha$ -SCS:**  $\alpha$ -succinil-CoA sintetasa

**$\mu\text{m}$ :** micrometros

# Índice

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
Tricomoniasis .....	6
Tricomoniasis: consecuencias y complicaciones. ....	8
Versatilidad biológica codificada en un genoma voluminoso .....	10
Dinámica de la interacción entre <i>Trichomonas vaginalis</i> y las células hospedadoras .....	13
Desde la señalización celular hasta la respuesta inmunitaria: las proteínas de superficie y factores secretados como mediadores claves .....	16
Las vesículas extracelulares .....	19
Las vesículas extracelulares en los parásitos protozoarios .....	22
Las vesículas extracelulares en <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	26
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Rol de la proteína TvVPS32 en la biogénesis de las VEs liberadas por el parásito <i>T. vaginalis</i> y su participación en el proceso de interacción con las células prostáticas .....</b>	<b>31</b>
1.1. Resumen.....	32
1.2. Introducción.....	33
1.3. Objetivos específicos .....	43
1.4. Metodología .....	45
1.4.1. Cultivo de parásitos.....	45
1.4.2. Transfección de parásitos.....	45
1.4.3. Cultivo de células NHrPE1 .....	46
1.4.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	46
1.4.5. Aislamiento de VEs .....	47
1.4.6. SDS-PAGE y Western Blot.....	48
1.4.7. Cuantificación de proteínas totales .....	48
1.4.8. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).....	48
1.4.9. Marcación de VEs .....	49
1.4.10. Ensayos de interacción de VEs con células prostáticas.....	49
1.4.11. Ensayos de adherencia de <i>T. vaginalis</i> a células del hospedador .....	49
1.4.12. Identificación de las proteínas presentes en las VEs mediante espectrometría de masa .....	50



1.4.13. Análisis estadísticos y gráficos .....	51
<b>1.5. Resultados .....</b>	<b>52</b>
1.5.1. La proteína VPS32 se localiza en las VEs liberadas por el parásito <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	52
1.5.2. La proteína VPS32 modula la secreción de VEs .....	54
1.5.3. La proteína VPS32 contribuye al incremento de la adherencia del parásito a la célula hospedadora .....	58
1.5.4. Las VEs de TvVPS32 modulan, al menos en parte, el aumento de la adherencia de los parásitos a las células hospedadoras.....	59
1.5.5. Las VEs de los parásitos TvVPS32 tienen una mayor capacidad de unión a las células hospedadoras que las VEs de los parásitos TvEpNEO.....	61
1.5.6. La proteína VPS32 regula la carga de las VEs liberadas .....	66

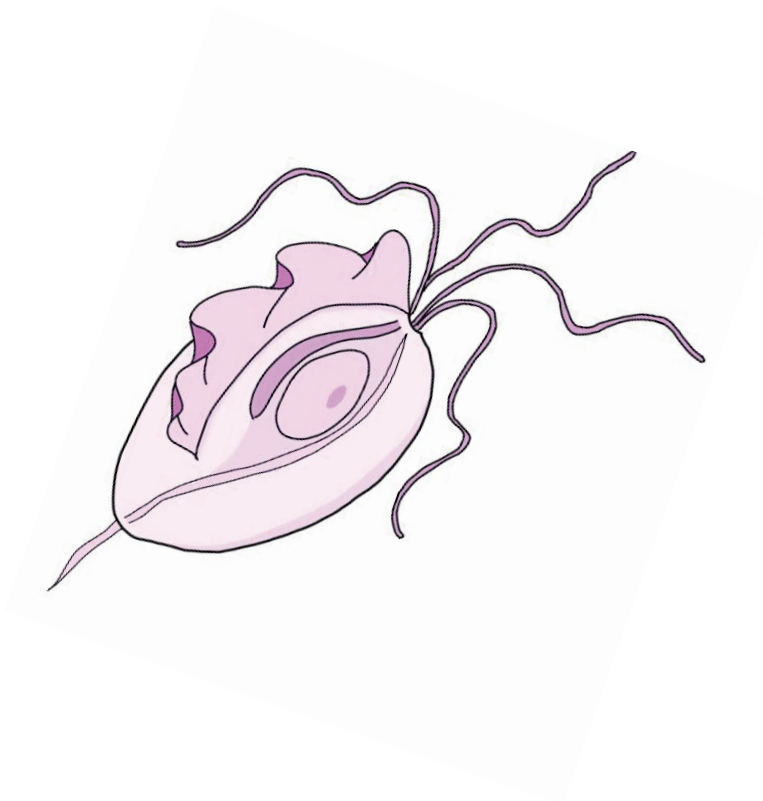
## **CAPÍTULO II**

### **Rol de los filopodios, citonemas y vesículas extracelulares en la interacción parásito-parásito en *Trichomonas vaginalis* .....**

<b>2.1. Resumen.....</b>	<b>78</b>
<b>2.2. Introducción.....</b>	<b>79</b>
<b>2.3. Objetivos específicos .....</b>	<b>86</b>
<b>2.4. Metodología .....</b>	<b>88</b>
2.4.1. Cultivo de <i>T. vaginalis</i> .....	88
2.4.2. Cultivo de células humanas.....	88
2.4.3. Marcaje fluorescente de parásitos.....	88
2.4.4. Microscopía electrónica de barrido .....	88
2.4.5. Análisis de la capacidad de agregación de parásitos .....	89
2.4.6. Co-incubación directa de parásitos de diferentes cepas .....	89
2.4.7. Co-incubación indirecta de parásitos de diferentes cepas .....	89
2.4.8. Aislamiento de VEs.....	90
2.4.9. Cuantificación de proteínas totales .....	90
2.4.10. Incubación de parásitos con VEs.....	90
2.4.11. Análisis de espectrometría de masas.....	90
2.4.12. Ensayo de adherencia .....	92
2.4.13. Gráficos y análisis estadísticos .....	92
<b>2.5. Resultados .....</b>	<b>93</b>
2.5.1. Los parásitos de cepas adherentes de <i>T. vaginalis</i> poseen más protrusiones de membrana en su superficie que parásitos poco adherentes.....	93
2.5.2. La presencia de citonemas se asocia a la formación de agregados celulares de parásitos.....	96

2.5.3. La interacción entre diferentes cepas induce la formación de protrusiones de membrana .....	100
2.5.4. Las vesículas extracelulares están involucradas en la comunicación entre parásitos de diferentes cepas .....	102
2.5.5. El contenido proteico de las VEs es dependiente de la cepa de origen.....	106
2.5.6. La comunicación entre parásitos de diferentes cepas aumenta la adherencia a las células hospedadoras .....	109
Discusión .....	114
<b>CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>123</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>125</b>

# RESUMEN

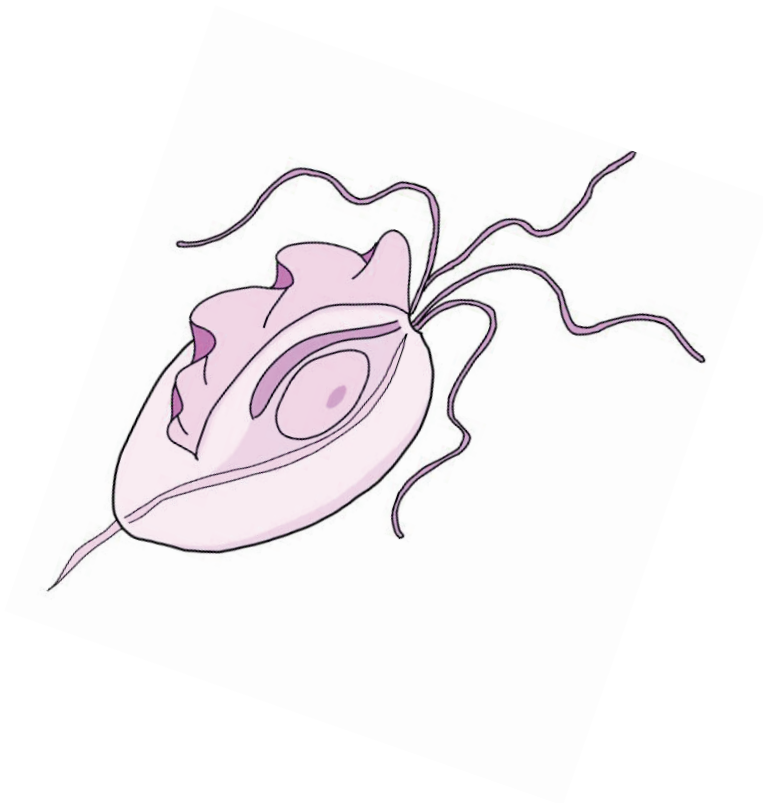


*Trichomonas vaginalis* es un parásito protozoario extracelular causante de la infección de transmisión sexual no viral más común del mundo: la tricomoniasis. *T. vaginalis* al ser un parásito extracelular obligado depende de la adherencia a las células del hospedador para desarrollar exitosamente la infección. Teniendo en cuenta la relevancia de la infección por *T. vaginalis*, así como también las complicaciones asociadas, surge una clara necesidad de mejorar la comprensión acerca de las herramientas que el parásito utiliza para adaptarse y manipular el entorno del hospedador para establecer la infección. Si bien los mecanismos de comunicación celular han sido ampliamente descritos en organismos multicelulares, en parásitos protozoarios esta disciplina permanece aún poco explorada. En este contexto, los objetivos de esta tesis se focalizaron en la caracterización de nuevos procesos relacionados con la interacción y la comunicación celular de *Trichomonas vaginalis*. En el **CAPÍTULO I** demostramos la importancia de la proteína VPS32 en la biogénesis y regulación de la carga proteica de las vesículas extracelulares liberadas por *T. vaginalis*. Además, observamos que los parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32 tenían mayor capacidad de adherencia a las células del hospedador. En el **CAPÍTULO II** demostramos la existencia de citonemas en *T. vaginalis* y que la formación de dichas estructuras de superficie en una cepa altamente adherente (CDC1132) se ve afectada por la presencia de cepas diferentes (G3 y B7RC2). También pudimos demostrar que la comunicación entre diferentes cepas está regulada por vesículas extracelulares y que el contenido proteico de las vesículas extracelulares es dependiente de cada cepa. Por último, demostramos que la comunicación entre distintas cepas de *T. vaginalis* fenotípicamente diferentes puede afectar la adherencia del parásito a las células hospedadoras.

En resumen, los resultados obtenidos en los dos capítulos aportan información novedosa para comprender el mecanismo de biogénesis de las vesículas extracelulares liberadas por el parásito *Trichomonas vaginalis*, y su relación con el proceso de interacción entre parásitos y con las células del hospedador.

**Palabras claves:** *Trichomonas vaginalis*, parásitos, vesículas extracelulares, comunicación, citonemas, filopodios.

# ABSTRACT

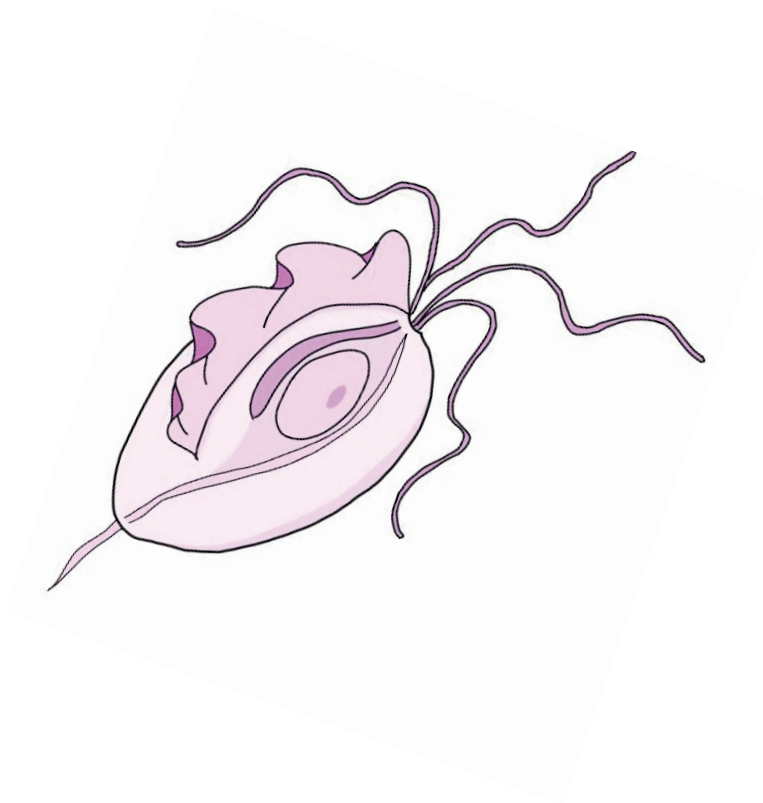


*Trichomonas vaginalis* is an extracellular protozoan parasite that causes the most common non-viral sexually transmitted infection in the world: trichomoniasis. *T. vaginalis*, being an obligate extracellular parasite, depends on adherence to host cells to successfully establish the infection. Given the relevance of *T. vaginalis* infection and its associated complications, there is a clear need to improve our understanding of the strategies that the parasite uses to adapt and manipulate the host environment to establish the infection. While cellular communication mechanisms have been extensively described in multicellular organisms, this field remains largely unexplored in protozoan parasites. In this context, the objectives of this thesis focused on characterizing new processes related to the interaction and cellular communication of *Trichomonas vaginalis*. In **CHAPTER I**, we demonstrated the importance of the VPS32 protein in the biogenesis and regulation of protein cargo in the extracellular vesicles released by *T. vaginalis*. Furthermore, we observed that parasites overexpressing the VPS32 protein had a greater capacity for adherence to host cells. In **CHAPTER II**, we demonstrated the existence of cytonemes in *T. vaginalis* and showed that the formation of these surface structures in a highly adherent strain (CDC1132) is affected by the presence of different strains (G3 and B7RC2). We were also able to show that the communication between different strains is regulated by extracellular vesicles and that the protein content of extracellular vesicles is strain-dependent. Finally, we demonstrated that communication between different phenotypically different strains of *T. vaginalis* can affect parasite adherence to host cells.

In summary, the results obtained in the two chapters provide novel information for understanding the mechanism of biogenesis of extracellular vesicles released by the parasite *Trichomonas vaginalis* and their relationship with the interaction process between parasites and host cells.

**Key words:** *Trichomonas vaginalis*, parasites, extracellular vesicles, communication, cytonemes.

# INTRODUCCIÓN



## Tricomoniasis

La tricomoniasis se presenta como una enfermedad de transmisión sexual no viral de gran incidencia a nivel mundial. Según datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud, en 2018 se reportaron 376 millones de nuevos casos de enfermedades de transmisión sexual no virales en adultos entre 15 y 49 años de edad, de los cuales 156 millones fueron causados por el parásito *Trichomonas vaginalis* (Rowley et al., 2019, p. 6; WHO, 2018). En comparación con otras enfermedades de transmisión sexual tratables, la tricomoniasis supera ampliamente la incidencia (cantidad de casos nuevos de una población determinada durante un periodo de tiempo específico) de la gonorrea y la sífilis las cuales se estima que causan en conjunto 93 millones de nuevos casos anuales; y de la clamidiasis que afecta a 127 millones de adultos infectados por año. La prevalencia (cantidad de casos en una población específica durante un periodo de tiempo determinado) de la infección por *T. vaginalis* se estima que es de 110 millones, siendo dichos valores similares a la clamidiasis (124.3 millones), pero mayores a la gonorrea (30.6 millones) y a la sífilis (19.9 millones). Cabe destacar que, aunque la tricomoniasis es una enfermedad global, su prevalencia e incidencia son mayores en las regiones de América y África en comparación con otras partes del mundo (Rowley et al., 2019) (Tabla 1).

Región	Incidencia		Prevalencia	
	Mujeres	Hombres	Mujeres	Hombres
	Por mil	Por mil	% de la población	% de la población
África	84	95	11,7	1,2
América	57	57	7,7	1,3
Sur de Asia	18	20	2,5	0,2
Europa	13	14	1,6	0,2
Mediterráneo oriental	37	38	4,7	0,5
Pacífico Occidental	44	46	5,6	0,6

**Tabla 1.** Incidencias y prevalencias de la infección por *T. vaginalis* en mujeres y hombres de 15 a 49 años en diferentes regiones del mundo en 2018. Tomado de Rowley et al., 2019, p. 6.



En cuanto a los datos sobre la tricomoniasis en países de Latinoamérica, se realizaron diferentes estudios que sugieren que la prevalencia varía de un país a otro. Por ejemplo, se estimó una prevalencia del 7,6% en Argentina (Salomón et al., 2011), 7,8% en Chile (Neira O. et al., 2005), 9,1% en Perú (Leon et al., 2009) y un rango de 2,6% a 20% en Brasil (Grama et al., 2013; Luppi et al., 2011; Rocha et al., 2014). Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos datos pueden subestimar la verdadera prevalencia de la enfermedad debido a que la tricomoniasis no es actualmente una enfermedad reportable (Hoots et al., 2013). En general, el conocimiento sobre la prevalencia real de la tricomoniasis y los factores que influyen en su incidencia sigue siendo limitado en Latinoamérica. Existen múltiples factores que pueden influir en la incidencia de la enfermedad, tales como la edad, la actividad sexual, la cantidad de compañeros sexuales, la presencia de otras enfermedades de transmisión sexual, el periodo menstrual y las condiciones sociales y económicas (Secor et al., 2014). Es importante destacar que la tricomoniasis afecta principalmente a mujeres de poblaciones desfavorecidas, tanto en países desarrollados como en aquellos con escasos recursos (Secor et al., 2014). En general, el conocimiento sobre la prevalencia real de la tricomoniasis y los factores que influyen en su incidencia sigue siendo limitado en Latinoamérica.

Desde hace más de 60 años, el tratamiento de la tricomoniasis ha estado basado en la administración de compuestos de tipo 5-nitroimidazoles, siendo el metronidazol el fármaco más utilizado debido a su bajo costo, eficacia y buena tolerancia en general. Aunque los efectos secundarios son leves, su uso en casos de infecciones recurrentes ha generado la aparición de cada vez más cepas resistentes. Estudios previos demuestran que del 2 al 10% de las cepas de *T. vaginalis* analizadas no responden al tratamiento con metronidazol (Conrad et al., 2013). La falta de alternativas terapéuticas para dichas infecciones resistentes ha llevado a la administración de dosis más altas o a tratamientos prolongados con el mismo fármaco, con la consecuente selección de cepas cada vez más resistentes y un aumento de la frecuencia de aparición de efectos secundarios (Helms et al., 2008; Sobel et al., 2001; Waters et al., 2005). En este contexto, cabe destacar que muchos pacientes pueden desarrollar reacciones anafilácticas a los 5-nitroimidazoles. En conclusión, debido a que las estrategias

de prevención y tratamiento actuales no han logrado disminuir la prevalencia de la infección, la tricomoniasis es considerada una enfermedad parasitaria desatendida y resulta indispensable optimizar las estrategias de abordaje para su control (Secor et al., 2014).

### **Tricomoniasis: consecuencias y complicaciones.**

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual que puede causar graves complicaciones en la salud pública. Aunque antes se creía que la enfermedad era sintomática en mujeres (Lehker & Alderete, 2000; Petrin et al., 1998; Sparks, 1991) y asintomática en hombres (Lehker & Alderete, 2000; Swygard et al., 2004); estudios recientes indicaron que alrededor del 80% de las infecciones son asintomáticas tanto en hombres como en mujeres (Allsworth et al., 2009; Leitsch, 2016; Poole & McClelland, 2013; Sutton et al., 2007), y que en función de esto, si el tratamiento es inadecuado o inexistente dicha infección puede persistir durante meses o inclusive años (Peterman et al., 2006).

En las mujeres la vagina es el foco de infección, pero los parásitos también pueden infectar la uretra y el endocervix (Bastida-Corcuera et al., 2005; Lehker & Alderete, 2000; Muzny & Schwebke, 2013; Sparks, 1991), causando inflamación de leve a moderada (Swygard et al., 2004; Wølner-Hanssen et al., 1989). Los síntomas incluyen abundantes descargas vaginales, espumosas y con mal olor, prurito y dolor durante la micción. Estos síntomas son causados por una intensa infiltración leucocitaria de la mucosa genital, lo cual promueve la inflamación y el aumento de la presencia de leucocitos polimorfonucleares en las secreciones vaginales (Lazenby et al., 2013). La inflamación puede producirse en las diferentes áreas del tracto genital femenino provocando vaginitis, cervicitis, endometritis, anexitis y la enfermedad inflamatoria pélvica (Cherpes et al., 2006; Fichorova, 2009). Las lesiones hemorrágicas puntiformes en el epitelio son el signo clínico más específico de la infección por *Trichomonas vaginalis* (Swygard et al., 2004; Wølner-Hanssen et al., 1989). En mujeres embarazadas la infección prolongada puede causar ruptura prematura del saco amniótico y del corion, partos prematuros y nacimientos de niños con bajo peso (Cotch et al., 1997; Mann et al., 2010; Minkoff et al., 1984). Además, la infección por *T. vaginalis* puede aumentar el riesgo relativo de lesión pre-invasiva y cáncer cervical invasivo si no se trata adecuadamente (Viikki et al., 2000).

Aunque es más prevalente en mujeres, los hombres también pueden verse afectados por esta infección. Sin embargo, debido a que la infección en hombres suele ser transitoria, autolimitada y asintomática, es menos conocida que en mujeres (Andersson et al., 2006; Hirt & Sherrard, 2015). Esto puede estar relacionado con la naturaleza oxidativa y las altas concentraciones de zinc presentes en los fluidos genitales masculinos, lo que se cree que puede actuar como factor citotóxico y/o inhibir ciertos factores de virulencia del parásito (Gimenes et al., 2014). Sin embargo, aunque en general la infección es asintomática, en algunos hombres puede causar uretritis, la cual se caracteriza por la presencia de secreciones claras o mucopurulentas, disuria y prurito leve, o sensación de ardor después de la relación sexual (Petrin et al., 1998). Además, la infección en hombres puede generar complicaciones tales como prostatitis, balanitis, epidídimo-orquitis y posiblemente infertilidad. También se ha observado que la infección en hombres se asocia con un aumento en la incidencia y en la severidad del cáncer de próstata y de la hiperplasia benigna de próstata (Mitteregger et al., 2012; Stark et al., 2009; Sutcliffe et al., 2006; Sutcliffe & Platz, 2008; Taylor et al., 2005). Recientemente, se ha demostrado experimentalmente que *T. vaginalis* podría favorecer la promoción y progresión del cáncer de próstata debido a que el parásito secreta una proteína llamada TvMIF que “emula” a su homólogo humano HsMIF, provocando un aumento en la inflamación y en la proliferación e invasión de células prostáticas (Twu et al., 2014).

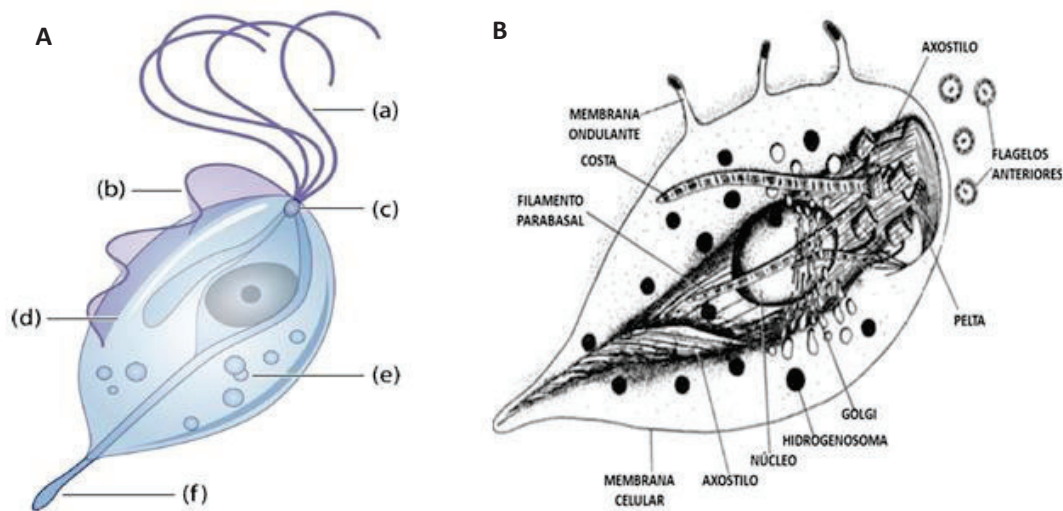
Por otro lado, la infección por *T. vaginalis* se ha asociado con la transmisión del VIH (virus de inmunodeficiencia humana) (Kissinger & Adamski, 2013; Sorvillo et al., 2001; Van Der Pol et al., 2008). Estudios epidemiológicos indican que la tricomoniasis genera un aumento de 2,7 veces del riesgo de adquirir VIH (Poole & McClelland, 2013). Este hallazgo es especialmente preocupante debido a la alta prevalencia de la tricomoniasis en la población general, y en particular en aquellos grupos de riesgo (Lehker & Alderete, 2000). Los investigadores postulan que el aumento en la susceptibilidad al VIH podría deberse a alguno/s de estos cuatro factores: (I) la inflamación que causa la infección por *T. vaginalis* provoca un aumento de linfocitos en la zona de infección, los cuales son blanco de la infección del VIH (Sardana et al., 1994); (II) la infección parasitaria puede

dañar la mucosa, causando lesiones hemorrágicas del epitelio genital, lo que podría facilitar la entrada del virus (Guenther et al., 2005); (III) que la infección por *T. vaginalis* produce alteraciones en la flora vaginal normal y este desbalance podría aumentar el riesgo de adquisición de VIH (Moodley et al., 2002); y (IV) *Trichomonas vaginalis* es capaz de internalizar el virus mediante endocitosis, lo que podría funcionar como un mecanismo tipo "caballo de troya" de transmisión del VIH (Hirt et al., 2011). También se ha descrito una asociación entre la infección por *T. vaginalis* y el virus del herpes simple II (HSV-2), con un aumento de la diseminación y la incidencia de HSV-2 en mujeres infectadas con *T. vaginalis* (Boselli et al., 2005; Gottlieb et al., 2004).

### **Versatilidad biológica codificada en un genoma voluminoso**

*T. vaginalis* es un parásito extracelular que coloniza el ambiente anóxico luminal de su hospedador para obtener nutrientes y sobrevivir. El trofozoíto es la forma vegetativa del parásito que se caracteriza por su capacidad de nutrirse, reproducirse e infectar. La nutrición del parásito se lleva a cabo mediante la pinocitosis y la fagocitosis de bacterias, descamaciones celulares y leucocitos, lo que puede provocar una disminución en el número de leucocitos (leucopenia) (Pereira-Neves & Benchimol, 2007). *Trichomonas vaginalis* no presenta reproducción sexual y se reproduce por división binaria longitudinal, lo que le permite alcanzar un gran número de individuos en poco tiempo; considerando que el tiempo de duplicación aproximado es de 6 horas (Schwebke & Burgess, 2004). El trofozoíto presenta un núcleo en la zona anterior (cerca del punto de inserción de los flagelos) y un citoesqueleto conformado por estructuras particulares: la costa, el axostilo, el cuerpo parabasal y la pelta; las cuales están compuestas por microtúbulos (Honigberg & King, 1964; Nielsen & Nielsen, 1975) (Figura 1). Este parásito carece de mitocondrias y en su lugar posee hidrogenosomas (organelas que poseen la capacidad de generar energía en condiciones anaeróbicas) (Boxma et al., 2005). Los hidrogenosomas importan piruvato y malato para producir ATP sin el uso de oxígeno como aceptor final de electrones. Como resultado de este proceso, se libera hidrógeno y acetato como productos finales (Ginger et al., 2010; Müller et al., 2012). El estudio de estas organelas ha sido de gran importancia a lo largo de los años, ya que las drogas

utilizadas para el tratamiento de la enfermedad son administradas como pro-drogas que necesitan ingresar al hidrogenosoma para activarse y ejercer su función (Cudmore et al., 2004; Leitsch et al., 2014). La activación de dichas pro-drogas genera radicales nitro citotóxicos que dañan a las proteínas y el ADN del parásito. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la producción de energía en *Trichomonas vaginalis* es crucial para el desarrollo de nuevas terapias para esta enfermedad.



**Figura 1.** Dibujo esquemático de *Trichomonas vaginalis*. **(A)** (a) Flagelo anterior; (b) membrana ondulante; (c) pelta; (d) costa; (e) hidrogenosomas; (f) axostilo. **(B)** Corte sagital donde se pueden ver las estructuras internas: la costa que es un haz de microtúbulos dispuesto en el interior de la célula y paralelo a la membrana ondulante (aporta rigidez a la célula y es el soporte de dicha membrana ondulante). El cuerpo parabasal constituido por dos o más fibras parabasales estriadas que conectan el aparato de Golgi al sistema flagelar. El axostilo que es un conjunto de microtúbulos trenzados que salen del centro de la célula y se proyectan más allá de ésta; y la pelta que es otra estructura de microtúbulos a continuación del axostilo hacia la parte anterior y que recubre parcialmente las estructuras basales de los flagelos. Imagen tomada de Bouchemal *et al.* (2017).

Como mencionamos previamente, *T. vaginalis* incorpora los nutrientes a partir de su hospedador, lo que ha permitido la racionalización de su metabolismo a través de la pérdida de ciertos genes (Barratt et al., 2015; Carlton et al., 2007; Ginger, 2006). Paradójicamente, a pesar de estas pérdidas, el genoma de *T. vaginalis* ha experimentado una expansión masiva (Zubáková et al., 2008). Posee un tamaño de aproximadamente 160 Mb y alrededor de 60 mil genes codificados en 6 cromosomas haploides (Carlton et al., 2007; S. B. Gould et al.,

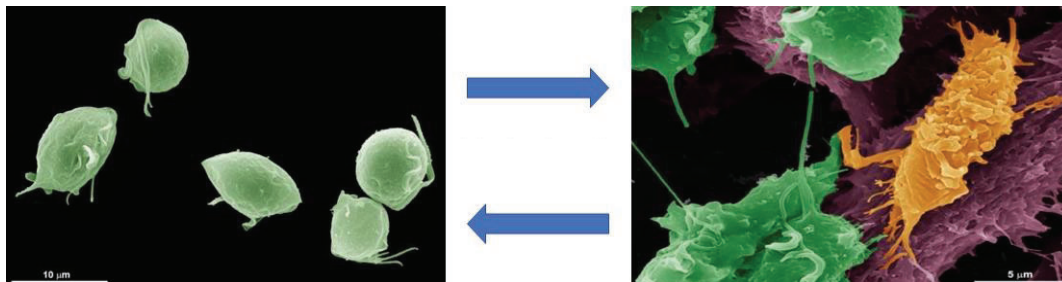
2013). A diferencia de otros parásitos relacionados como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, *T. vaginalis* muestra una considerable expansión en el tamaño del genoma debido a que posee un gran número de duplicaciones de genes, repeticiones, elementos transponibles (TEs) y pseudogenes (Andersson et al., 2006; Barratt et al., 2015; Carlton et al., 2007; Horváthová et al., 2012; Klodnicki et al., 2013; Kusdian & Gould, 2014; Morin-Adeline et al., 2014, 2015; Singh et al., 2011; Woehle et al., 2014). A pesar de esta masiva expansión, se cree que hasta el 65% del genoma consiste en secuencias repetitivas (S. B. Gould et al., 2013; Kusdian & Gould, 2014). Estos hallazgos sugieren una complejidad genómica única y mecanismos de regulación de la expresión muy controlados en *T. vaginalis*, los cuales podrían ser importantes para adaptarse a entornos anóxicos y nutricionalmente limitantes en el hospedador.

En cuanto a los elementos transponibles, estos son considerados mediadores claves en la duplicación de genes y se cree que han influido en la evolución de los tricomonadidos (Bradic et al., 2014). En *T. vaginalis* muchos genes duplicados permanecen funcionales (Woehle et al., 2014), como aquellos asociados con la infección, mantenimiento, colonización, virulencia y adquisición de nutrientes, los cuales están especialmente expandidos (Kusdian & Gould, 2014). Un ejemplo de expansión masiva es la familia de proteínas tipo BspA la cual posee 911 miembros en la cepa G3 y se cree que podría estar implicada en procesos de patogénesis en *T. vaginalis*, debido a que estos genes regulan la adherencia e invasión en organismos procariotas (Noël et al., 2010). De manera similar, la familia de cisteína-proteasas, reconocidos factores de virulencia claves en patógenos protozoarios, presenta una considerable expansión en *T. vaginalis* en comparación con otros parásitos anaerobios emparentados (Christy & Petri, 2011; Hernández et al., 2014). Asimismo, la superfamilia de Ras GTPasas y quinasas, que regulan el tráfico vesicular, la transducción de señales durante la fagocitosis y la motilidad, así como también la transición de *T. vaginalis* hacia su estado ameboideo, presenta una considerable expansión en los tricomonadidos (Abhyankar et al., 2012; Bosch & Siderovski, 2013, 2015; Lal et al., 2005; Somlata et al., 2011). En *T. vaginalis*, se han encontrado 65 genes relacionados a la superfamilia de Rab GTPasas (Lal et al., 2005) y en *E. histolytica* 91 genes

(Bosch & Siderovski, 2013). En conclusión, considerando la existencia de una gran expansión de genes relacionados con la forma de vida de este parásito, (podría estar relacionada con la capacidad de *T. vaginalis* para colonizar, sobrevivir en el hospedador y adaptarse a diversos ambientes.

## Dinámica de la interacción entre *Trichomonas vaginalis* y las células hospedadoras

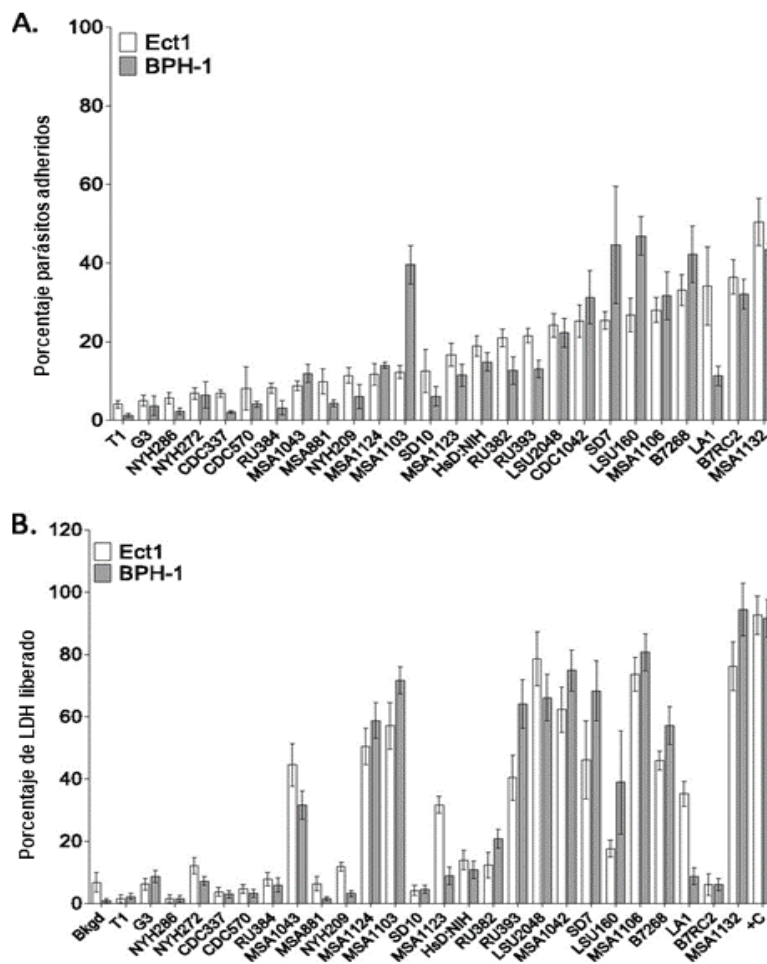
*Trichomonas vaginalis* es un parásito exclusivamente extracelular, por lo tanto, la adherencia de los parásitos a las células hospedadora es esencial para el establecimiento de la infección. El parásito posee una forma ovalada (trofozoíto) cuando se encuentra en cultivo axénico; con un tamaño de 9 a 23  $\mu\text{m}$  de longitud y 7  $\mu\text{m}$  de ancho. No obstante, cuando se adhiere a las células del hospedador durante el proceso de infección cambia drásticamente su morfología, transformándose en ameboide en pocos minutos (Figura 2).



**Figura 2.** Distintas morfologías celulares de *Trichomonas vaginalis*. Los trofozoítos en su forma ovoide (izquierda, color verde) ante la presencia de la célula hospedadora (derecha, color violeta) cambian a su forma ameboide (derecha, color verde y anaranjado) aumentando así la superficie de contacto con el hospedador. Las imágenes fueron tomadas mediante microscopía electrónica de barrido en colaboración con el Dr. Antonio Pereira-Neves (Brasil).

Esta transformación implica que los trofozoítos libres se aplanen, reorganicen el citoesqueleto y maximicen la superficie de contacto; favoreciendo de esta manera la adherencia a las células del hospedador (Fritz-Laylin et al., 2010; Ryan et al., 2011). Esta capacidad de transformación morfológica se correlaciona con la capacidad de adherencia a la célula hospedadora de cada cepa (Lustig et al., 2013). Existen distintas cepas de *Trichomonas vaginalis*, aisladas de diversas regiones geográficas que presentan características

fenotípicas particulares; algunas de estas cepas presentan una baja capacidad de transformación al estado ameboideo, mientras que otras, se vuelven completamente ameboideas cuando se exponen a las células del hospedador (Jesus et al., 2004; Lustig et al., 2013). En un estudio realizado por Lustig *et al.* (2013) donde se caracterizaron 26 cepas de *T. vaginalis*, observaron que la capacidad de adherencia a la célula hospedadora varía dependiendo de la cepa analizada y que la adherencia generalmente era necesaria para que ocurra la citólisis de la célula hospedadora (Figura 3). Específicamente, mostraron que aquellas cepas con baja capacidad de adherencia (Figura 3A) generalmente no eran capaces de dañar la célula hospedadora (Figura 3B).

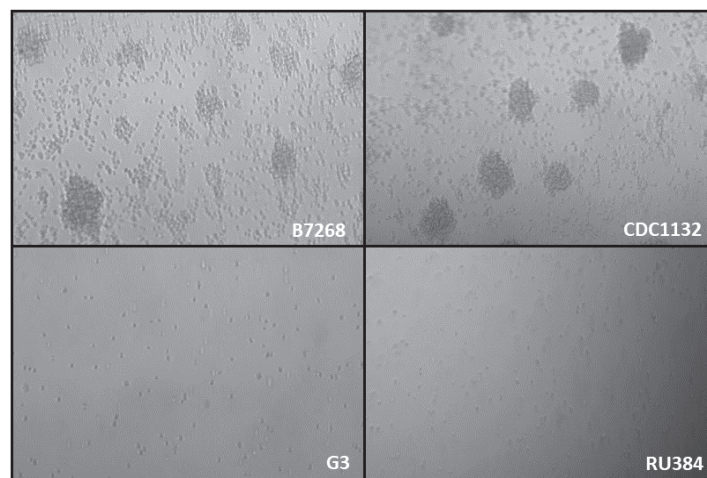


**Figura 3.** Adherencia y citólisis de distintas cepas de *Trichomonas vaginalis*. **(A)** Adherencia de distintas cepas de *T. vaginalis* a monocapas de células humanas ectocervicales (Ect-1, barras blancas) o de próstata (BPH-1, barras grises). Los datos muestran el promedio de porcentaje de parásitos adheridos en tres experimentos independientes. Se puede observar que las distintas cepas de *T. vaginalis* poseen capacidades de adherencia muy variables. Entre las menos adherentes se encuentran las cepas T1 y G3, y entre las más adherentes



las cepas B7RC2, B7268 y MSA1132 (también llamada CDC1132). **(B)** Citólisis de *T. vaginalis* a Ect-1 (barras blancas) y BPH-1 (barras grises). Los parásitos fueron expuestos a monocapas de células epiteliales y el grado de citólisis se determinó mediante la liberación de LDH (lactato deshidrogenasa). Se observó cierto grado de correlación entre la capacidad de adherencia y la citólisis de la célula hospedadora de las cepas de *T. vaginalis*. Por ejemplo, T1 y G3, las cuales son poco adherentes, tienen baja capacidad citolítica. Por el contrario, las cepas altamente adherentes B7268 o MSA1132 son cepas muy citolíticas. Es interesante destacar que algunas cepas como B7RC2, altamente adherente, no muestran correlación con el nivel de citólisis. Figura tomada de Lustig *et al.* (2013).

Sin embargo, el nivel de citólisis causado por las cepas altamente adherentes no necesariamente se correlacionaba con su capacidad de adherencia a la célula hospedadora. Es decir, estos datos sugieren que para que se desencadene la citólisis es necesario un umbral de adherencia, pero cuando éste es alcanzado, el grado de citólisis ya no es determinado por la adherencia de los parásitos, sugiriendo así la existencia de otros factores determinantes involucrados en este proceso (Lustig *et al.*, 2013). Por otro lado, la capacidad de una cepa de adherirse a la célula hospedadora se correlaciona con su capacidad de formar agregados de parásitos en cultivos *in vitro* (Figura 4) (Coceres *et al.*, 2015); y la formación de dichos agregados podría estar relacionada con la citotoxicidad de cada cepa (Coceres *et al.*, 2015; Hirt *et al.*, 2011); y con la defensa frente a la respuesta inmune del hospedador (Honigberg, 1990).



**Figura 4.** Imágenes de agregados celulares formados por *T. vaginalis* en cultivo *in vitro*. Como se observa en las imágenes, las cepas más adherentes a la célula hospedadora B7268 y CDC1132 (panel superior) forman grandes agregados de células en contraste con las cepas poco adherentes G3 y RU384 (panel inferior) que no forman agregados. Imágenes tomadas con microscopio óptico (10X de magnificación). Figura tomada de Coceres *et al.* (2015).

Si bien aún se desconocen muchos de los factores que regulan la formación de estos agregados; un trabajo de nuestro grupo demostró que la proteína tetraspanina 8 (TvTSP8), localizada en la superficie celular, está involucrada en la formación de agregados en *T. vaginalis* (Coceres et al., 2015). Curiosamente, se ha observado que el cultivo prolongado en el laboratorio de una cepa que habitualmente forma agregados y es altamente adherente a células del hospedador, no solo conduce a la pérdida de su capacidad de adherencia a la célula hospedadora (como fue descrito para T1 y G3) sino también a la pérdida de la capacidad de formar agregados celulares. Estas observaciones también estarían sugiriendo que los procesos de adherencia y agregación podrían involucrar factores comunes que regulen estos procesos. La identificación de marcadores moleculares específicos de las distintas formas celulares de *T. vaginalis* (estadios trofozoíto y ameboideo; y agregados de parásitos) resulta un requisito esencial para investigar la relevancia de cada una de estas formas celulares durante el proceso de infección.

### **Desde la señalización celular hasta la respuesta inmunitaria: las proteínas de superficie y factores secretados como mediadores claves**

Teniendo en cuenta que *T. vaginalis* es un patógeno extracelular, se cree que su capacidad de colonización exitosa depende de diversos mecanismos: la degradación de componentes de la mucosa y proteínas de la matriz extracelular (Costa et al., 2005; Fiori et al., 1997); la adherencia a las células hospedadoras tales como las células epiteliales vaginales y células del sistema inmune (Pereira-Neves & Benchimol, 2007); la fagocitosis de las bacterias vaginales y de las células hospedadoras (Pereira-Neves & Benchimol, 2007); la endocitosis de proteínas del hospedador, y la degradación de los anticuerpos IgG e IgA y proteínas del complemento. Considerando lo expuesto anteriormente, se han realizado estudios con el objetivo de describir diferentes factores que podrían estar involucrados en el proceso de patogénesis de *T. vaginalis* (Tabla 2).

Tipo	Nombre	Clase de proteína	Función	Referencia
Glicocáliz	Glico-conjugados	n/a	Azúcares de la superficie celular del glicocáliz necesarias para la adherencia	(Mirhaghani and Warton 1998)
	Lipoglicano (LG)		Regula la adherencia a la célula hospedadora mediante su unión al receptor galectina-1 de humanos.	(Bastida-Corcuera et al., 2005, Fichorova et al., 2016, Okumura et al., 2008, Ryan et al., 2011)
Secreción	TvCP1, TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCP39, TvCP65 y TvCPT	Cisteína proteasas	Degradación de MEC humana y apoptosis de VECs <i>in vitro</i> .	(Sommer et al. 2005, Pina- Vazquez et al. 2012, Cárdenas-Guerra et al. 2013, Kummer et al., 2008)
	sVEs	n/a	Vesículas secretadas por el parásito, que contienen ARN y proteínas, facilitan la adherencia al hospedador y alteran la respuesta inmune.	(Twu et al. 2013, Olmos-Ortiz et al. 2017, Rai and Johnson 2019, Artuyants et al., 2020)
	IVes	n/a	Vesículas que protruyen de la membrana plasmática, contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Influyen en la adherencia al hospedador.	(Nievas et al. 2018)
	TVLEGU-1	Cisteína proteasa	Se encuentra involucrada en adherencia	(Rendon-Gandarilla et al. 2013)
	TvROM1 y TvROM3	Proteasas romboides. Serina proteasas	Citólisis de las células ectocervicales del hospedador.	(Riestra et al. 2015)
	MA, SB, SC	Serina y cisteína proteasas	De tipo GP63; tipo subtilisina y tipo calpaina. Posible degradación de la MEC humana.	(Hirt et al. 2007)
Superficie	BspA	Adhesinas de bacterias	Gran familia de proteínas de superficie, probablemente involucradas en adherencia y/o variación antigénica.	(Hirt et al. 2007, Noël et al. 2010, Hirt 2013, Handrich et al. 2019)
	LBP	Proteína de unión a lectina y laminina	Laminina y lectina aumentan la adherencia de <i>T. vaginalis</i> .	(Casta e Silva Filho F 1988)
	Pmp, IMA, LLF, GVMP, P270	Adhesinas	Proteína polimórfica de membrana de <i>Chlamydia</i> , antígeno inmunodominante variable de superficie, familia de lectinas tipo leguminosas, proteína de membrana de <i>Giardia</i> tipo VSP, inmunógeno de superficie P270. Función no determinada.	(Casta e Silva Filho F 1988, Handrich et al. 2019)
	Proteína tipo cadherina	Glicoproteína transmembrana	Cumple una función de adherencia dependiente de calcio	(Chen et al. 2019)
	TvTSP6, TvTSP8	Tetraspaninas	Proteínas regulatorias de membrana plasmática que aumentan su expresión durante la adherencia del parásito a la célula hospedadora. TvTSP6 regula el proceso de migración y TvTSP8 induce la formación de agregados celulares de parásitos.	(Hemler 2005, de Mguel et al. 2012, Coceres et al. 2015)
	TvAD1	Proteína de superficie	TvAD1 desempeña un papel en la interacción con moléculas de heparan-sulfato del hospedador.	(Molgora et al. 2021)
	Bap1, Bap2	Proteínas de superficie	Proteínas de membrana que aumentan la adherencia de los parásitos poco adherentes cuando son sobre-expresadas.	(de Miguel et al. 2010)

**Tabla 2.** Factores posiblemente involucrados en el proceso de patogénesis de *T. vaginalis* caracterizados hasta el momento. MEC: matriz extracelular. n/a: no asignado; VECs: células

vaginales epiteliales. MA: metaloproteasa. SB: subtilisina. SC: serina proteasa. PMP: proteínas de membrana polimórficas de *Chlamydia*. LLF: Familia de lectinas similares a las leguminosas. GVMP: Proteína de membrana similar a VSP de *Giardia*. IVSA: Antígeno de superficie variable inmunodominante. Tomado de Kusdian *et al.* (2014).

Por otro lado, en los últimos años se han realizado diversos estudios proteómicos y glicobiológicos para comprender el proceso de patogénesis de *T. vaginalis*. Dichos estudios han sido claves para demostrar que el lipoglicano (LG), una molécula de la superficie que forma parte del glicocáliz, desempeña un rol clave en el proceso de adherencia de *T. vaginalis* a las células del hospedador. El LG es el factor de adherencia del parásito mejor estudiado, el análisis detallado de la estructura del LG, sumado a estudios funcionales, permitieron demostrar que la adherencia del parásito a las células epiteliales de vagina está mediada por la unión del LG a las proteínas galectina 1 y 3 de las células del hospedador (Bastida-Corcuera *et al.*, 2005; Fichorova *et al.*, 2016; Okumura *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2011).

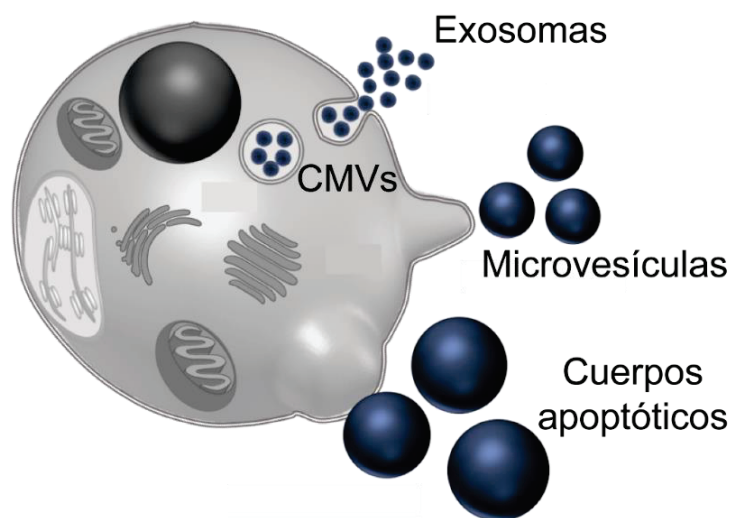
Teniendo en cuenta los distintos mecanismos descritos para el desarrollo de la infección de este parásito, es lógico suponer que las proteínas de superficie y los componentes secretados al espacio extracelular podrían ser reguladores centrales del proceso de la interacción patógeno-hospedador (Casadevall & Pirofski, 2001). En un intento por identificar nuevas proteínas de superficie relevantes para el proceso de adherencia del parásito, un estudio proteómico comparativo de la superficie de tres cepas adherentes y tres cepas poco adherentes del parásito identificó 411 proteínas localizadas en la superficie (de Miguel *et al.*, 2010); muchas de las cuales podrían ser posibles factores de virulencia en *T. vaginalis*. Entre dichas proteínas identificadas, se destacan las BspA, que median la adherencia en bacterias (Noël *et al.*, 2010); tres tipos de proteasas: GP63 (Hirt *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2003), serina-peptidasas tipo subtilisina (Blackman, 2008; Roiko & Carruthers, 2009) y cisteína-proteasas tipo calpaína (Glading *et al.*, 2002); proteínas de membrana polimórficas de *Chlamydia* (Pmp) (Wehrl *et al.*, 2004); el antígeno inmunodominante variable de superficie (M17) presente en *Entamoeba histolytica* (Edman *et al.*, 1990; Marion & Guillén, 2006); y el inmunógeno de superficie P270 de *T. vaginalis* (Musatovova & Alderete, 1998). Las proteínas de superficie TVAG\_244130

(BAP1) y TVAG\_188850 (BAP2) median la adherencia (de Miguel et al., 2010) y las proteínas tetraspaninas tienen diferentes funciones regulatorias de distintos procesos como ser la migración celular (TvTSP6) (de Miguel et al., 2012), la formación de agregados celulares (TvTSP8) (Coceres et al., 2015) en los parásitos. La proteína TVAG\_157210 (TvAD1) que cumple un rol en la regulación de la adherencia de los parásitos a la célula hospedadora a través de la interacción con el heparán sulfato (Molgora et al., 2021).

### **Las vesículas extracelulares**

En los últimos años, muchos estudios realizados se han focalizado en identificar distintos factores secretados por el parásito que contribuyen al desarrollo de la infección (Tabla 2). En este sentido, distintas proteasas secretadas han sido descritas como factores claves en la regulación del procesos de adherencia y citotoxicidad del parásito (Tabla 2). Específicamente se destacan las proteínas cisteína proteasas TvCP2, TvCP3, TvCP4, TvCPT (Kummer et al., 2008) las cuales se encuentran involucradas en la apoptosis de células epiteliales de vagina; la cisteína proteasa TVLEGU-1 que se encuentra en la superficie del parásito y está regulada por hierro, y presenta afinidad por la superficie de las células de adenocarcinoma cervical (HeLa) (Rendón-Gandarilla et al., 2013); las proteasas romboides TvROM1 y TvROM3 que desempeñan un papel en la adherencia del parásito (Riestra et al., 2015) y por último, las proteasas del tipo GP63, las cuales se propone que tienen un rol importante en la patogenicidad de *T. vaginalis* al unirse a varios componentes del hospedador (Hirt et al., 2007). Si bien las proteasas secretadas han sido descritas como factores importantes del proceso de patogénesis, en los últimos años se ha demostrado que las vesículas extracelulares (VEs) liberadas por *T. vaginalis* también tienen un rol destacado en el proceso de interacción con el hospedador. Las VEs son partículas membranosas liberadas por los distintos tipos celulares al medio extracelular que tienen un rol importante en comunicación celular (Théry et al., 2018) (Figura 5). Durante muchos años, se han utilizado diferentes términos para nombrarlas, dependiendo de su tamaño (micropartículas, microvesículas, nanovesículas), del mecanismo de biogénesis (exosomas, microvesículas, cuerpos apoptóticos), del tejido o célula de origen (prostasomas, oncosomas), de sus posibles funciones

(vesículas de matriz calcificante, argosomas, tolerosomas), o simplemente de su presencia fuera de la célula (exosomas, ectosomas). Aunque la nomenclatura aún es objeto de debate (S. J. Gould & Raposo, 2013), la comunidad científica ha consensuado la nomenclatura que los distintos tipos de VEs se clasifiquen en tres categorías principales en función de su biogénesis, tamaño y función: (I) Exosomas, que se originan a partir de la invaginación de la membrana de los cuerpos multivesiculares (CMVs) y tienen un tamaño de entre 30 y 200 nm; (II) Microvesículas (MVs), también conocidas como micropartículas o ectosomas, que se generan por protrusión y extrusión de la membrana plasmática y tienen tamaños de entre 100 y 1000 nm (van Niel et al., 2018); y (III) Cuerpos apoptóticos, que pueden tener tamaños de hasta 5000 nm y se originan a partir de células en proceso de muerte celular programada (Caruso & Poon, 2018).



**Figura 5. Las vesículas extracelulares tienen distintos orígenes.** La membrana de los cuerpos multivesiculares (CMVs) se invagina formando pequeñas vesículas internas denominadas vesículas intraluminales, las cuales contienen proteínas, ARNm y miARN del citosol de la célula. Estas vesículas internas son liberadas al espacio extracelular como exosomas cuando los CMVs se fusionan con la membrana plasmática de la célula. Las células también secretan otros tipos de vesículas, llamadas microvesículas, las cuales se forman mediante protrusión directa y posterior extrusión de la membrana plasmática de la célula. Se sabe que estas vesículas también transportan proteínas activas, ARN y otros compuestos específicos. Por último, las células liberan cuerpos apoptóticos en condiciones patológicas y fisiológicas cuando se activa la muerte celular programada. Figura tomada de <https://everzom.com/exosomes/>.

Actualmente los métodos de enriquecimiento de VEs mayormente utilizados incluyen la ultracentrifugación, la utilización de partículas magnéticas recubiertas

de anticuerpos, dispositivos microfluídicos, tecnologías de precipitación polimérica y exclusión por tamaño (Brennan et al., 2020). Estos métodos de aislamiento suelen dar como resultado preparaciones heterogéneas enriquecidas en una o más poblaciones de VEs (Momen-Heravi et al., 2013). Considerando que en la actualidad no existe ningún método eficaz para la separación exitosa de las distintas poblaciones de VEs, y que mayoritariamente los métodos de aislamiento se basan en la separación por tamaño, se ha propuesto que las distintas poblaciones aisladas sean clasificadas como VEs grandes (IVEs) y VEs pequeñas (sVEs) (Witwer et al., 2017). Tradicionalmente, el protocolo más utilizado para el aislamiento de VEs es la centrifugación diferencial, que implica múltiples pasos de centrifugación y ultracentrifugación. En general, el protocolo de centrifugación comienza con una centrifugación a baja velocidad (300-500 g durante 10-15 min) para sedimentar las células, seguida (en algunos casos) de una filtración a través de un filtro de poro 0,22  $\mu\text{m}$  o 0,8  $\mu\text{m}$ , luego una centrifugación a velocidad media (10.000 a 20.000x g durante 20 min) para recoger las IVEs y, finalmente, un paso de ultracentrifugación a 100.000x g durante más de 1 hora para recuperar las sVEs (Brennan et al., 2020). En este punto cabe destacar que, en la presente tesis doctoral, utilizaremos los términos sVEs para las vesículas obtenidas luego de la centrifugación a 100.000x g y IVEs para las vesículas recuperadas luego de la centrifugación a 10.000-20.000x g.

El estudio de exosomas y microvesículas ha generado un interés creciente en los últimos años teniendo en cuenta la relevancia de sus funciones asociadas. Es interesante destacar que ambos tipos de vesículas son capaces de mediar la transferencia horizontal de una amplia gama de moléculas, incluyendo proteínas de la membrana plasmática y citoplasmáticas, ácidos nucleicos (miARN, ADN, ARNm) y lípidos (Choi et al., 2013, 2015; Shifrin Jr. et al., 2013; Yoon et al., 2014). Este proceso de transferencia de información puede provocar modificaciones significativas en el fenotipo de las células receptoras, y por tanto, estas vesículas representan una nueva modalidad de intercambio y comunicación intercelular (Thery, 2011).

## Las vesículas extracelulares en los parásitos protozoarios

Los protozoos patógenos son capaces de liberar vesículas extracelulares, las cuales modulan el sistema inmunológico del hospedador y contribuyen a establecer la infección mediante la transferencia de una amplia gama de moléculas contenidas en dichas vesículas (Camacho et al., 2023; Nievas et al., 2020). En *Plasmodium falciparum*, el agente causal de la enfermedad de la malaria (Cowman et al., 2012), se ha identificado una amplia variedad de componentes de carga activa en las VEs, como ADN genómico (Regev-Rudzki et al., 2013; Sisqueña et al., 2017), ARN (Mantel et al., 2013, 2016; Ofir-Birin et al., 2021; Ye et al., 2018), proteínas parasitarias y del hospedador (Abou Karam et al., 2022; Dekel et al., 2021), glicanos (Ben Ami Pilo et al., 2022) y lípidos (Borgheti-Cardoso et al., 2020; Gulati et al., 2015). Además, la composición de la carga en las VEs cambia con la etapa de desarrollo del parásito, lo que sugiere que el contenido de las VEs es dependiente de estadio (Avalos-Padilla et al., 2021). Las VEs liberadas por *P. falciparum* promueven varios procesos asociados a patogénesis ya que contribuyen por ejemplo al establecimiento de la malaria cerebral (la complicación neurológica más grave de esta parasitosis). Específicamente, se ha demostrado que las VEs liberadas por *P. falciparum* son capaces de manipular la respuesta inmunológica del hospedador (Mantel et al., 2013; Ofir-Birin et al., 2021; Sisqueña et al., 2017; Ye et al., 2018) y ayudan a promover cambios vasculares que regulan la activación y permeabilidad de las células endoteliales (Debs et al., 2019; Mantel et al., 2016). En *Toxoplasma gondii*, el agente causal de la toxoplasmosis (Attias et al., 2020; Matta et al., 2021), se ha demostrado que las VEs liberadas por el parásito modulan la respuesta inmunitaria de los macrófagos murinos mediante la inducción de IL-10, TNF- $\alpha$  e iNOS, probablemente entregando miARN a las células hospedadoras (Silva et al., 2018). También se ha demostrado que las VEs de *T. gondii*, inducen la secreción de citoquinas inflamatorias IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , mediadas a través de la vía JNK en macrófagos murinos (Y. Li, Xiu, et al., 2018). Además, los ratones BALB/c inoculados con VEs derivadas de *T. gondii* mostraron respuestas inmunitarias humorales y celulares, así como un tiempo de supervivencia prolongado (Y. Li, Liu, et al., 2018), protegiendo a los ratones contra la infección aguda por parásitos. Estos resultados pueden sugerir que las



VEs podrían servir como candidatos a vacunas contra la toxoplasmosis (Y. Li, Liu, et al., 2018). También se ha demostrado que las VEs secretadas por fibroblastos de prepucio humano (Wowk et al., 2017) o células dendríticas (D.-L. Li et al., 2019) infectadas con *T. gondii* exhiben un perfil único de proteínas y ácidos nucleicos que difiere significativamente de las VEs derivadas de células no infectadas (D.-L. Li et al., 2019; Wowk et al., 2017). Las VEs liberadas por el parásito *Trypanosoma brucei*, parásito causante de “la enfermedad del sueño” (Nussbaum et al., 2010), se han asociado a múltiples funciones biológicas relevantes para la patogénesis, entre las cuales se incluyen la transferencia de antígenos y factores de virulencia (principalmente de las glicoproteínas de superficie variantes) (Szempruch, Sykes, et al., 2016), la supervivencia de los parásitos extracelulares en la sangre (Geiger et al., 2010), la lisis de los eritrocitos del hospedador (Szempruch, Sykes, et al., 2016), la manipulación de la respuesta inmunitaria (Stijlemans et al., 2016) y la inflamación del sistema nervioso central (Dozio et al., 2019). Esta variedad de funciones apunta hacia diferentes subpoblaciones de VEs generadas mediante diferentes mecanismos de biogénesis. Un trabajo reciente realizado en este parásito describió una subpoblación de VEs específica que se origina a partir de nanotubos (Szempruch, Sykes, et al., 2016), los cuales son proyecciones filamentosas de membrana altamente dinámicas de hasta 20  $\mu\text{m}$  que se originan en el bolsillo flagelar de estos microorganismos (Geiger et al., 2010; Szempruch, Sykes, et al., 2016). Estas VEs derivadas de nanotubos se identificaron por primera vez en trypomastigotes en la fase sanguínea (Szempruch, Sykes, et al., 2016) y luego también en los trypomastigotes procíclicos que residen en los organismos vectores (Eliaz et al., 2017). Las VEs también se han aislado con éxito en la mayoría de las etapas del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Dantas-Pereira et al., 2021), incluyendo el epimastigote invasor de los vectores (Paranaíba et al., 2019; Retana Moreira et al., 2021), amastigotes axénicos (Bonfim-Melo et al., 2018), tripomastigotes (de sangre, derivados de cultivos de tejidos y metacíclicos) (Caeiro et al., 2018; Neves et al., 2014; Retana Moreira et al., 2021; Trocoli Torrecilhas et al., 2009), y de células hospedadoras infectadas por *T. cruzi* (Cronemberger-Andrade et al., 2020, p. 2). Las VEs han sido asociadas a diversas funciones, incluyendo la invasión de células hospedadoras (Garcia-Silva et al., 2014; Neves et al., 2014; Ramirez et al., 2017; Retana Moreira et al.,

2019), patogénesis y progresión de la enfermedad (Trocoli Torrecilhas et al., 2009; Wyllie & Ramirez, 2017), colonización de vectores y metacicloogénesis (Garcia-Silva et al., 2014; Paranaiba et al., 2019), y evasión y manipulación del sistema inmunológico (De Pablos et al., 2016; Díaz Lozano et al., 2017; Nogueira et al., 2015). Las VEs derivadas de *T. cruzi* regulan tanto las formas agudas como crónicas de la enfermedad de Chagas (de Pablos Torró et al., 2018) a través de la modulación de la inflamación y la señalización remota entre los tripomastigotes extracelulares y los amastigotes intracelulares en diversos nichos de células hospedadoras (de Pablos Torró et al., 2018). Al igual que en *T. brucei* y *T. cruzi*, las VEs secretadas por *Leishmania* desempeñan roles esenciales en su patogénesis, incluyendo la regulación de células inmunes (Castelli et al., 2019; Hassani & Olivier, 2013; Nogueira et al., 2020), invasión y proliferación intracelular (Colineau et al., 2017), formación de lesiones cutáneas (Atayde et al., 2015), reclutamiento de células inmunes (Hassani et al., 2014) y progresión de la enfermedad (Dong et al., 2019; Ghosh et al., 2013). Se han aislado VEs de la mayoría de las etapas del ciclo de vida del parásito *Leishmania*, incluyendo amastigotes axénicos (Lambertz et al., 2015), amastigotes intracelulares en macrófagos infectados (Gioseffi et al., 2020; Hassani & Olivier, 2013; Soto-Serna et al., 2020), promastigotes procíclicos y metacíclicos (Atayde et al., 2015; Castelli et al., 2019; Forrest et al., 2020), lo que indica que tanto sus formas intracelulares como extracelulares producen VEs. Además, se determinó que las VEs que se originan en amastigotes y promastigotes tienen diferentes tamaños (Castelli et al., 2019). El perfil proteómico de los promastigotes procíclicos y metacíclicos también es único (Forrest et al., 2020), lo que sugiere que estas etapas podrían tener vías de formación específicas que generan VEs con diferentes cargas y tamaños en estos parásitos.

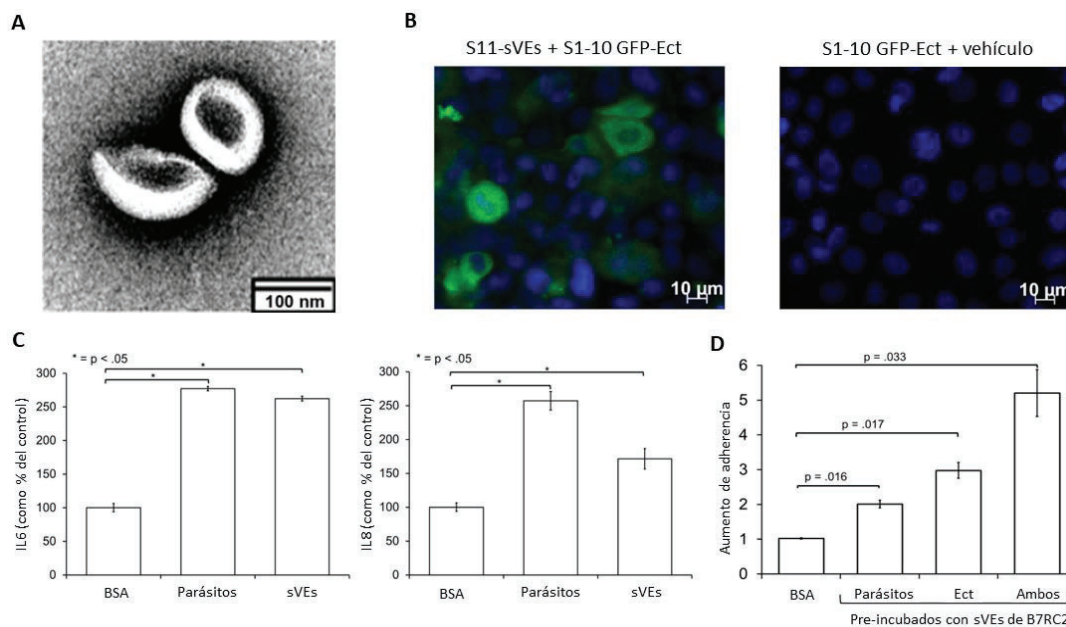
Además de los efectos ampliamente descritos sobre células del hospedador, las VEs son capaces de transferir factores de virulencia, genes de resistencia a fármacos y factores de diferenciación entre los parásitos (Nievas et al., 2020). En este sentido, se ha demostrado que *Leishmania* utiliza VEs para transportar genes de resistencia a fármacos y se ha visto un impacto significativo en el fenotipo de los parásitos receptores inducido por la expresión del ADN transferido (Douanne et al., 2022). Trabajos realizados en *Plasmodium*

*falciparum* también demostraron que las VEs permiten que los parásitos se comuniquen entre sí mediante el intercambio de carga activa, incluso cuando se encuentran dentro de los glóbulos rojos humanos infectados (Mantel et al., 2013; Sisqueira et al., 2017).

En parásitos anaerobios también se demostró que las VEs tienen un rol importante en comunicación celular e interacción con células del hospedador. Las VEs secretadas por *Entamoeba histolytica* fueron caracterizadas mediante análisis proteómico (Sharma et al., 2020), y se han identificado poblaciones específicas de ARN pequeño cargadas en VEs (Sharma et al., 2020). Se demostró que estas VEs regulan la comunicación parásito-parásito durante el proceso de enquistación (Sharma et al., 2020): mientras que las VEs derivadas de quistes promovieron la enquistación de trofozoítos activos, las VEs derivadas de trofozoítos previnieron la formación de quistes (Sharma et al., 2020). *Giardia lamblia* es el agente causal de la giardiasis, una enfermedad gastrointestinal que afecta tanto a humanos como a animales (Koehler et al., 2014). Estos parásitos contienen vacuolas periféricas acidificadas (APVs) localizadas junto a la membrana plasmática que actúan parcialmente como endosomas y lisosomas (Adam, 2001; Midlej et al., 2019). Mediante microscopía electrónica de alta resolución, se encontró que algunas de dichas APVs contenían vesículas intraluminales (ILVs); lo que sugiere que estas organelas podrían actuar como CMVs o cuerpos multivesiculares en estos parásitos (Midlej et al., 2019). Se han descrito además dos poblaciones distintas de VEs (Gavinho et al., 2020; Moyano et al., 2019), con tamaños y perfiles proteómicos diferentes: vesículas similares a exosomas (EIVs) y microvesículas (Gavinho et al., 2020; Moyano et al., 2019). Ambos subtipos son internalizados por células de mamíferos (Gavinho et al., 2020) y las microvesículas son capaces de activar levemente las células dendríticas inmaduras (Evans-Osses et al., 2017). Además, las VEs de *Giardia* también poseen un rol en la ruptura de las uniones epiteliales intestinales del hospedador y en la inhibición del crecimiento de bacterias comensales (Siddiq et al., 2020); lo que podría explicar la prevalencia de síndromes postinfecciosos después de la erradicación de la enfermedad (Fink & Singer, 2017; Siddiq et al., 2020).

## Las vesículas extracelulares en *Trichomonas vaginalis*

En *T. vaginalis* se han realizado diversos estudios que demuestran ampliamente la importancia de las VEs en la regulación de la respuesta inmunitaria y en la adherencia del parásito a las células hospedadoras (Nievas et al., 2018; Olmos-Ortiz et al., 2017; Rai & Johnson, 2019; Twu et al., 2013). En un trabajo inicial, realizado por Twu *et al* (2013), se demostró que *T. vaginalis* libera vesículas pequeñas (sVEs) que poseen forma y tamaño semejantes a los exosomas liberados por otros tipos celulares (Figura 6A), los cuales tienen la capacidad de unirse a las células del hospedador y descargar su contenido en el interior de las mismas (Figura 6B). Además, se demostró que las sVEs tienen propiedades inmunomoduladoras, ya que se observó que la co-incubación de dichas sVEs con células epiteliales de vagina indujo la liberación de IL8 e IL6 en estas últimas (Figura 6C). Por otro lado, las sVEs aisladas de cepas de parásitos adherentes aumentan la adherencia a las células epiteliales de vagina de los parásitos poco adherentes (Figura 6D); lo que sugiere que el contenido de estas vesículas es específico para cada cepa (Twu et al., 2013).



**Figura 6.** Caracterización de sVEs liberadas por *T. vaginalis*. **(A)** Imagen obtenida mediante tinción negativa (microscopía electrónica) demuestra que las sVEs aisladas de *T. vaginalis* tienen características morfológicas similares a las de los exosomas liberados por otros tipos celulares. **(B)** Células ectocervicales transfectadas con un fragmento de GFP (GFP-S1-10) que no emite fluorescencia fueron incubadas con sVEs expresando el fragmento complementario de GFP (GFP-S11), el cual tampoco es capaz por sí solo de producir fluorescencia. Luego las células fueron lavadas, fijadas y teñidas con 4',6'-diamidino-2-

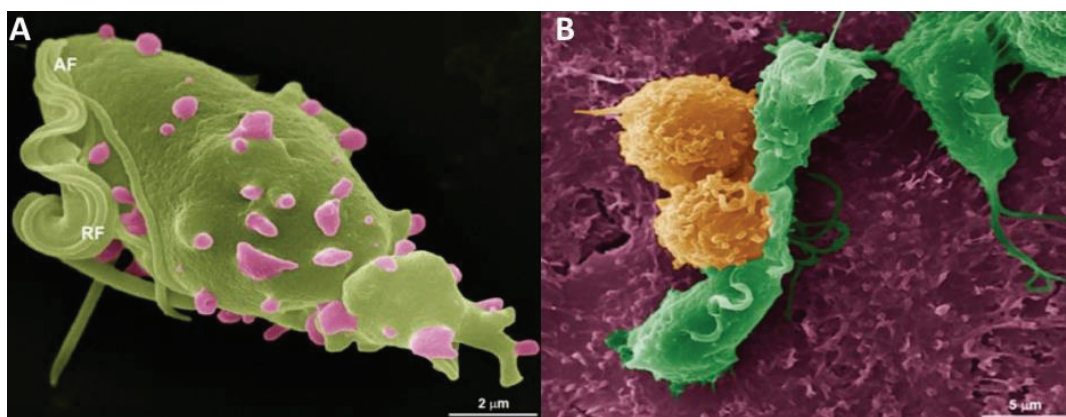
fenilindol (DAPI). La fluorescencia verde en las células (producto de la interacción de ambos fragmentos de GFP) demuestra que las sVEs liberan su contenido dentro de la célula hospedadora. Como control, se muestra la ausencia de fluorescencia en las células del hospedador transfectadas con el fragmento S1-10 GFP solo **(C)** Liberación de las citoquinas IL6 e IL8 de la célula hospedadora (Ect). Las células Ect fueron incubadas con 9 µg de BSA (seroalbúmina bovina), 9 µg de sVEs o 5 x 10<sup>5</sup> parásitos durante 6 horas y luego se cuantificaron las IL6 e IL8 liberadas en el sobrenadante mediante ELISA. Se puede observar que las sVEs aislados inducen la liberación de las citoquinas IL6 e IL8. **(D)** sVEs aisladas de una cepa altamente adherente (B7RC2) se pre-incubaron con parásitos de la cepa G3 (poco adherente), células ectocervicales, o ambas. Luego se midió si la pre-incubación afectaba la capacidad de adherencia de los parásitos de la cepa G3 a la célula hospedadora. Como control negativo se pre-incubaron las células con cantidades similares de BSA. Cabe destacar que la pre-incubación de los parásitos y/o de las células hospedadoras con sVEs de la cepa B7RC2 favorece la adherencia de los parásitos de la cepa poco adherente. Además, se observa un efecto aditivo cuando tanto parásitos como células hospedadoras son pre-incubadas con estas sVEs. Tomado de Twu *et al.* (2013).

Teniendo en cuenta el trabajo seminal de Twu *et al.*, 2013, posteriormente se han realizado distintos estudios relacionados a la importancia de las sVEs en la patogénesis de *T. vaginalis*. En un trabajo realizado por Olmos-Ortiz y colaboradores (2017) se demostró que la incubación con sVEs aisladas de *T. vaginalis* indujo un aumento de más de quince veces en la expresión de IL-10 y un aumento de dos veces en los niveles de expresión de IL-6 y TNF-α en macrófagos. Estos resultados sugieren que las sVEs de *T. vaginalis* tienen un rol inmunomodulador sobre el perfil de citocinas de las células hospedadoras. Con el objetivo de establecer el mecanismo mediante el cual las sEVs inducen una respuesta en las células del hospedador, en un estudio reciente se demostró que las sVEs de *T. vaginalis* se unen específicamente al heparán sulfato (HS) presente en los proteoglicanos de la superficie celular y son internalizadas por las células hospedadoras (Rai & Johnson, 2019). Además, se ha demostrado que la unión con el HS está mediada por una proteína presente en la superficie de las VEs denominada 4-α-glucanotransferasa (Tv4AGT). Por último, se definió que la internalización sucede mediante endocitosis mediada por “*lipid raft*”, en un proceso independiente de la clatrina y dependiente de colesterol y de caveolina-1 (Rai & Johnson, 2019).

Como hemos mencionado con anterioridad, las VEs pueden estar cargadas con distintas moléculas biológicas (proteínas, lípidos o ácidos nucleicos) (Szempruch, Dennison, *et al.*, 2016). En este contexto un trabajo reciente reportó que las sVEs de *T. vaginalis* poseen un alto contenido de ARN de tamaño pequeño específico del tipo (tsARN) (Artuyants *et al.*, 2020). Los tsARN

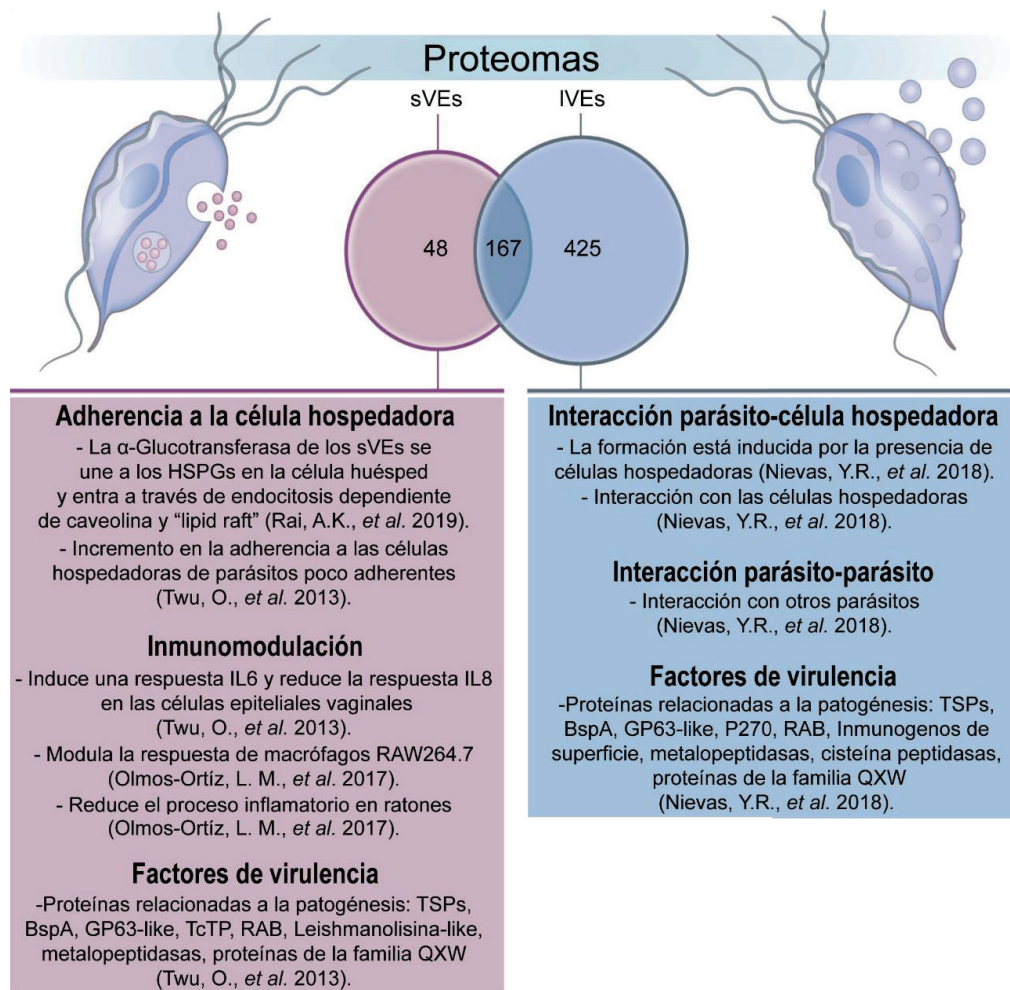
representan una clase relativamente nueva de pequeños ARN no codificantes con función regulatoria (Keam & Hutvagner, 2015) que son ubicuos en la naturaleza (Kumar et al., 2014). Se producen mediante el clivaje endonucleolítico de los tARNs, formando ya sea mitades de tARN (de 30-40 nt de longitud) o fragmentos cortos derivados de tARN (de 18-22 nt de longitud), dependiendo del sitio de clivaje (Dhahbi, 2015). El contenido específico de estos ARNs pequeños en la VEs de *T. vaginalis* sugiere que los mismos pueden tener un rol importante en la comunicación del parásito con la célula hospedadora (Artuyants et al., 2020).

En un estudio realizado por nuestro laboratorio, se ha evidenciado que *T. vaginalis* además de sVEs, libera también microvesículas (MVs) que protruyen desde la superficie celular, a partir tanto del soma como de la membrana flagelar del parásito (Nievas et al., 2018). Mediante el empleo de técnicas de análisis de microscopía electrónica y proteómica, se demostró que estas estructuras poseen características físicas análogas a las vesículas extracelulares liberadas por células de mamíferos, y que están selectivamente enriquecidas con proteínas específicas. Además, se observó que la formación de dichas MVs se induce en presencia de células hospedadoras, lo que sugiere su participación en la comunicación entre el parásito y su hospedador (Nievas et al., 2018) (Figura 7).



**Figura 7.** Microvesículas en *T. vaginalis*. **(A)** Imagen representativa de microscopía electrónica de barrido que demuestra la presencia de microvesículas protruyendo de la membrana plasmática de parásitos en condiciones habituales de crecimiento. **(B)** Micrografía que evidencia la presencia de parásitos con vesículas en su superficie (parásitos amarillos) junto a parásitos que no forman vesículas (parásitos verdes) incubados con células HeLa (violeta) en una relación parásito-célula 5:1. Tomado de Nievas *et. al.* (2018).

En resumen, la patobiología de *T. vaginalis* es multifacética ya que involucra una multitud de factores y diversos mecanismos. Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que las distintas poblaciones de VEs cumplen un rol clave en la interacción del parásito con la célula hospedadora (Artuyants et al., 2020; Nievas et al., 2018; Olmos-Ortiz et al., 2017; Rai & Johnson, 2019; Twu et al., 2013). Cabe destacar que si bien no ha sido estudiado en detalle, trabajos previos también sugieren que las VEs podrían estar involucradas en la comunicación parásito-parásito (Twu et al., 2013) (Figura 8).



**Figura 8.** Rol de las VEs en *Trichomonas vaginalis*. Las VEs modulan la adherencia del parásito a las células hospedadoras, en ellas se liberan factores de virulencia que regulan la respuesta inmune del hospedador. Tomado de Nievas et al. 2020.

En este contexto, el objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral está focalizado en el estudio de la biogénesis de las VEs liberadas por el

**parásito *T. vaginalis* y la relevancia que tienen dichas VEs en la comunicación parásito-parásito, así como también parásito-hospedador.** Este trabajo será dividido en dos capítulos independientes que tienen como objetivo profundizar el estudio del rol de las VEs de *T. vaginalis* de manera complementaria:

En el **capítulo I**, cuyo título es “**Rol de la proteína TvVPS32 en la biogénesis de las VEs liberadas por el parásito *T. vaginalis* y su participación en el proceso de interacción con las células prostáticas**”, nos propusimos analizar el rol de la proteína VPS32, una proteína del complejo ESCRT, en la formación tanto de exosomas como de microvesículas y en la adherencia del parásito a las células hospedadoras.

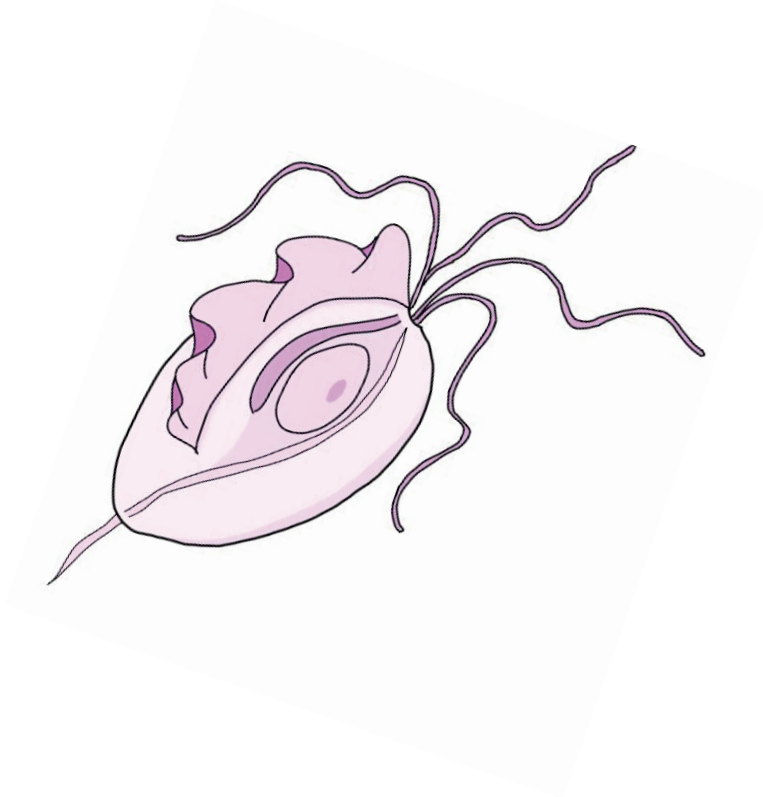
En el **capítulo II**, cuyo título es “**Rol de los filopodios, citonemas y las vesículas extracelulares en la interacción parásito-parásito en *Trichomonas vaginalis***”, evaluamos la importancia de las VEs y las protrusiones de membranas en la comunicación parásito-parásito y el impacto de esta comunicación en la adherencia del parásito a células del hospedador.

Consideramos que los resultados obtenidos en ambos capítulos favorecen la comprensión de la patogénesis de *T. vaginalis* mediante la identificación de mecanismos que hasta el momento no habían sido estudiados, vinculados a los procesos de comunicación celular entre parásitos y adherencia a la célula hospedadora.



# CAPÍTULO I

**Rol de la proteína TvVPS32 en la biogénesis de las VEs liberadas por el parásito *T. vaginalis* y su participación en el proceso de interacción con las células prostáticas**



## 1.1. Resumen

*Trichomonas vaginalis* es un parásito de transmisión sexual que coloniza el tracto urogenital humano, donde permanece adherido extracelularmente a las células epiteliales del hospedador durante el proceso de infección. Se ha descrito que las vesículas extracelulares son actores importantes en la patogénesis de este parásito, ya que contienen proteínas y ARN que pueden ser incorporados por la célula hospedadora y modular el proceso de adherencia. El complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés) es un complejo multiproteico que participa en diferentes procesos relacionados a la remodelación de las membranas. Algunos componentes del complejo ESCRT se encuentran involucrados en la biogénesis de las VEs en otras células. En este primer capítulo, mostramos que la proteína VPS32, un miembro del complejo ESCRTIII, contribuye a la biogénesis y selección de carga proteica de las vesículas extracelulares en el parásito *T. vaginalis*. Además, observamos que los parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32 muestran un aumento en la adherencia a las células hospedadoras en comparación con los parásitos control; lo que sugiere un rol clave de esta proteína en la interacción de este parásito con las células hospedadoras. Estos resultados proporcionan información valiosa sobre los mecanismos moleculares involucrados en la biogénesis de las vesículas extracelulares, la clasificación de la carga proteica y la patogénesis del parásito.

## 1.2. Introducción

### Biogénesis de las vesículas extracelulares

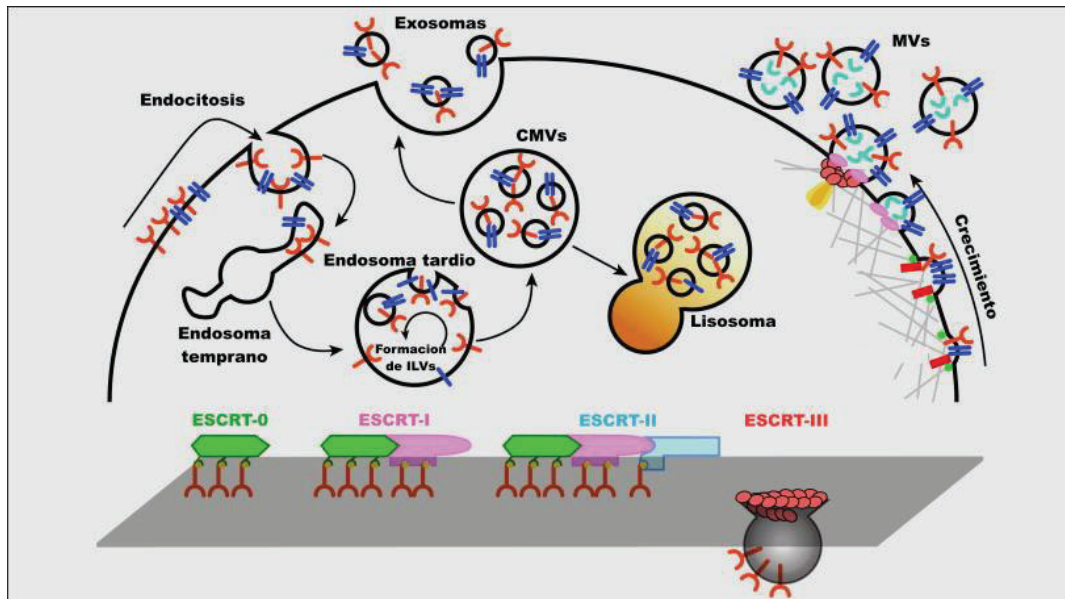
Como se describió previamente, las VEs se clasifican en tres grandes grupos de acuerdo a su tamaño y origen: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (Yáñez-Mó et al., 2015). Dada la relevancia demostrada de las VEs en distintos tipos celulares, la comprensión del proceso de biogénesis de las distintas poblaciones de VEs ha sido objeto de estudio de diversos grupos de investigación en los últimos años (Teng & Fussenegger, 2021). Los exosomas se forman como vesículas intraluminales (ILVs) dentro del lumen de endosomas durante su maduración en los CMVs; mientras que las MVs se forman a partir de protrusiones de la membrana plasmática. Aunque los procesos iniciales que llevan a la formación de exosomas y MVs parecen ser en gran medida diferentes, tanto la formación de las ILVs dentro de los endosomas como la génesis de MVs en la superficie celular involucra la acumulación de componentes en pequeños dominios de la membrana que experimentan gemación (Figura 1.1) (Cocucci & Meldolesi, 2015). Los exosomas derivan de la formación de CMVs, los cuales son endosomas tardíos cargados con ILVs. En muchos casos, los CMVs son intermediarios de la vía lisosomal degradativa; en la cual estas organelas pueden fusionarse con los lisosomas dando como resultado la descarga y digestión de sus ILVs en el lumen lisosomal (Bissig & Gruenberg, 2014; Bucci et al., 2000; Luzio et al., 2009, 2010). Alternativamente, los CMVs pueden fusionarse con la membrana plasmática y descargar su contenido; liberando las ILVs como exosomas en el espacio extracelular (Bissig & Gruenberg, 2014; Bobrie & Théry, 2013; Kowal et al., 2014). Durante el proceso de formación de CMVs, los pequeños dominios de membrana se enriquecen con varias moléculas, incluyendo lípidos como el colesterol (Bissig & Gruenberg, 2014; Chevallier et al., 2008), el ácido lisobisfosfatídico (un fosfolípido no convencional, no detectado en otras partes de la célula) (Bissig & Gruenberg, 2014; Chevallier et al., 2008; Kobayashi et al., 1999, 2002; Morel et al., 2011), y esfingomielinas (Bissig & Gruenberg, 2014; Trajkovic et al., 2008). Un aspecto crítico de este proceso es la acumulación y procesamiento de proteínas ubiquitinadas que son transferidas por el “complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte”

(ESCRT) del citosol de la membrana plasmática y de los endosomas a las ILVs en formación (Figura 1.1) (Bissig & Gruenberg, 2014; Buschow et al., 2009; Clague et al., 2012; Colombo et al., 2013; Henne et al., 2011). El complejo multiproteico ESCRT está formado por 4 subunidades que desempeñan roles distintos: ESCRT-0 que se une y secuestra las proteínas ubiquitinadas; el ESCRT-I, que en conjunto con ESCRT-II, inicia la protrusión local de la membrana endosomal; y el ESCRT-III, que a través de su interacción con la enzima fosfotirosina fosfatasa de dominio histidina (HD-PTP), participa en la desubiquitinación de proteínas (Bissig & Gruenberg, 2014; Buschow et al., 2009; Clague et al., 2012; Colombo et al., 2013; Henne et al., 2011; Hurley & Odorizzi, 2012) (Figura 1.1). Además, ESCRT-III permite la separación por estrangulamiento de las ILVs dar origen a los exosomas. La interacción de las subunidades ESCRT, con su proteína asociada Alix, sus homólogos y otros, también permite la acumulación de la carga luminal (Bissig & Gruenberg, 2014; Hurley & Odorizzi, 2012). Si bien está ampliamente detallado que el complejo ESCRT está involucrado en la formación de ILVs, también se ha descrito la existencia de un mecanismo de formación de exosomas independiente de ESCRT (Teng & Fussenegger, 2021). Específicamente, un análisis realizado donde eliminaron componentes de cada uno de los cuatro complejos ESCRT, demostró que se seguían formando CMVs cargados con ILVs positivas para el marcador CD63 (Stuffers et al., 2009). Este mecanismo de formación de exosomas independiente de ESCRT requiere la generación de ceramida por esfingomielinasa tipo II neutra (Trajkovic et al., 2008). En este contexto, se ha reportado que las proteínas de la familia de las tetraspaninas regulan la formación de ILVs en la vía de clasificación endosomal independiente de ESCRT. La proteína CD63, una proteína de la familia tetraspanina particularmente enriquecida en la superficie de los exosomas, se ha demostrado que está involucrada en la biogénesis de exosomas en fibroblastos, así como también en melanocitos (Theos et al., 2006; van Niel et al., 2011). De manera similar, las tetraspaninas CD81, CD82 y CD9 están involucradas en la formación de exosomas (Buschow et al., 2009; Chairoungdua et al., 2010). Estas proteínas forman microdominios de membrana dinámicos con otras tetraspaninas así como también con otras proteínas transmembrana y citosólicas (Charrin et al., 2014) y regulan la carga dentro de los exosomas (Odintsova et al., 2013). En

resumen, se ha demostrado la existencia de mecanismos dependientes e independientes de ESCRT en la biogénesis de los exosomas, y el mecanismo puede variar según las proteínas que sean reclutadas y el tipo de célula.

Las MVs se ensamblan mediante la gemación regulada hacia afuera de pequeños dominios de la membrana plasmática (Cocucci et al., 2009; Mause & Weber, 2010; Schifferli, 2011; Shifrin Jr. et al., 2013). En comparación con el ensamblaje de las ILVs, el proceso inicial que conduce al ensamblaje de las MVs parece ser muy diferente (Figura 1.1). Sin embargo, al igual que los lípidos que contribuyen a la gemación de las ILV, el colesterol, la esfingomielina y la ceramida son importantes para la formación de las MVs (Antonucci et al., 2012; Bianco et al., 2009; Shifrin Jr. et al., 2013). Además, si bien algunas proteínas de membrana de las MVs como tetraspaninas e integrinas están presentes en los exosomas, otras son exclusivas de las MVs. La acumulación de proteínas de carga en el lumen de las MVs, que a menudo es más grande que el de las ILVs, ocurre mediante diversos mecanismos. Inicialmente, se consideraba que la maquinaria ESCRT era importante únicamente para la formación de ILVs en los CMVs. Sin embargo, el complejo ESCRT también desempeña un papel importante en procesos que involucran la clasificación proteica, protrusión y fisión de membranas, como son el proceso de citocinesis y la liberación de partículas virales (Bissig & Gruenberg, 2014; Fang et al., 2007; Van Engelenburg et al., 2014). Evidencia reciente demuestra que al menos algunas subunidades ESCRT participan en la formación y protrusión de MVs a partir de la membrana plasmática (Figura 1.1). Específicamente, se demostró que la proteína TSG101 de la subunidad ESCRT-I regula la formación de MVs por medio de la interacción con Alix y otra proteína accesoria, ARRDC1 (Nabhan et al., 2012). Además, se demostró que el complejo ESCRT-III es crítico para el estrangulamiento de la membrana y liberación de MVs en células animales (Nabhan et al., 2012). Un punto clave en la biogénesis de las vesículas es la separación de la membrana para ser liberadas al lumen de los CMVs o al espacio extracelular; sin embargo, los mecanismos por los cuales los exosomas y las MVs logran liberarse al espacio extracelular son significativamente diferentes (Figura 1.1). Entre las moléculas que probablemente estén activas en dicho proceso se encuentran: la ceramida, que se acumula en la membrana de ambos tipos de vesículas (Bianco

et al., 2009; Trajkovic et al., 2008); la escramblasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , que favorece el intercambio de fosfolípidos entre las dos caras de la membrana aumentando la curvatura de la misma y favoreciendo la extrusión de las vesículas; anexina-2 (Zhang et al., 2013) y sintasa de hialuronano 3 (Rilla et al., 2013). La escisión de membranas requiere el complejo ESCRT y sus proteínas asociadas, especialmente la AAA-ATPasa Vps4, que es crítica para el desmontaje del complejo proteico (Lata et al., 2008). En este sentido, se han propuesto varios modelos para interpretar la interacción de ESCRT-III con la superficie citoplásmica de ILVs y los dominios de las MVs (Fabrikant et al., 2009; Lenz et al., 2009; Saksena et al., 2009). Uno de los modelos propuestos (Cashikar et al., 2014), demuestra el papel crítico de los filamentos de ESCRT-III en la formación de ILVs. Esta etapa es seguida por la reorganización de los filamentos ESCRT-III en espirales cónicas que inducen la formación de dominios de membrana. Finalmente, la constricción por la ATPasa Vps4 del anillo de espirales ESCRT-III en el cuello de formación conduce a la escisión de la membrana, con la consiguiente liberación de la vesícula (Adell et al., 2014; Cashikar et al., 2014; Henne et al., 2011). Este modelo también es válido y aceptado para la liberación de MVs (Figura 1.1).



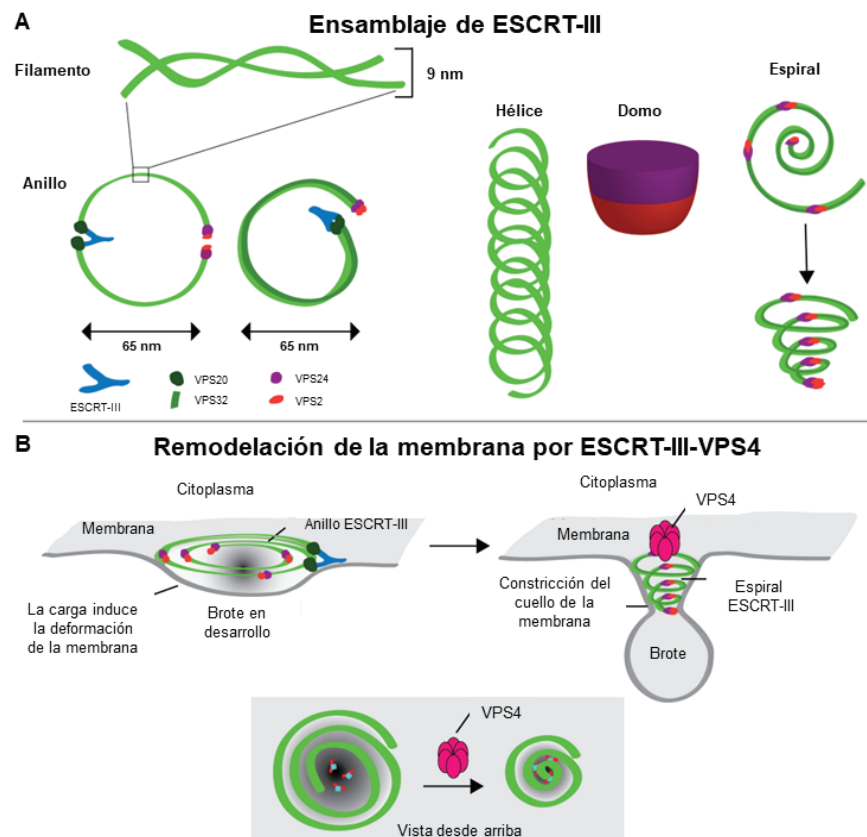
**Figura 1.1. Biogénesis de exosomas y MVs.** A la izquierda se representa la biogénesis de exosomas. Las proteínas transmembrana (rojas) son endocitadas y transportadas a endosomas tempranos. Una vez clasificadas en endosomas tardíos, la subunidad ESCRT-0 recluta proteínas ubiquitinadas, mientras que ESCRT-I y -II median en la formación de

vesículas intraluminales (ILVs). El cuerpo multivesicular (CMV) puede seguir una vía de degradación fusionándose con lisosomas (anaranjado) o liberar las ILVs como exosomas hacia el espacio extracelular mediante exocitosis. La formación de MVs se ilustra en la parte derecha. En la membrana plasmática, las proteínas transmembrana (azules) se agrupan en dominios de membrana discretos que promueven la formación de vesículas hacia afuera. Las tetraspaninas y otras proteínas abundantes en estos microdominios pueden tener un rol al promover la selección de otros componentes. Los anclajes lipídicos (como la palmitoilación) de las proteínas (verdes) acumulan proteínas en el lumen y contribuyen a la curvatura de la membrana. Los mecanismos adicionales de formación de MVs incluyen las escramblasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  (rectángulos rojos), que aleatorizan la distribución de lípidos entre las dos caras de la membrana plasmática. El citoesqueleto (gris claro) se vuelve más laxo, mientras que las proteínas citosólicas y las moléculas de ARN (verde claro) se clasifican en las MVs. TSG101 reclutado, un miembro del complejo ESCRT-I, media en la movilización a la membrana plasmática de ESCRT-III (subunidad color salmón), que promueve la formación de un espiral. La ATPasa específica VPS4 (amarillo) media en el desmontaje de la espiral tirando de su extremo. Tomada de Cocucci and Meldolesi, 2015.

### **Subunidad ESCRT-III: el complejo asociado a endosomas y requerido para la selección de carga proteica dentro de los CMVs**

La selección de proteínas en los CMVs requiere la función del complejo ESCRT. Las proteínas Vps2, Vps20, Vps24 y VPS32 (también llamada Snf7), las cuales forman parte de la subunidad ESCRT-III, son reclutadas desde el citoplasma a las membranas endosomales para regular la clasificación proteica dentro de los CMVs (Babst et al., 2002). El complejo ESCRT-III está formado por dos subcomplejos funcionalmente distintos: el subcomplejo Vps20-VPS32 que se une a la membrana endosomal y el subcomplejo Vps2-Vps24 que se une al complejo Vps20-VPS32 y, sirve para reclutar cofactores adicionales a este sitio de clasificación de proteínas. El complejo ESCRT-III y Vps4 son necesarios para contraer y escindir las membranas (Murk et al., 2003); y para ello, los subcomplejos de ESCRT-III se ensamblan en pequeños anillos y espirales con diámetros que van desde 15 hasta 150 nm, o en grandes filamentos de ESCRT-III que abarcan varios micrómetros en las zonas de constricción del cuerpo medio; lo que estaría indicando que la arquitectura de los complejos de ESCRT-III puede adaptarse a la geometría de la membrana (Alonso Y Adell et al., 2016) (Figura 1.2A). Los eventos de brotación de membrana impulsados por ESCRT-III requieren la homooligomerización de VPS32 (Teis et al., 2010). La presencia de ESCRT-II y Vps20 parece "forzar" a VPS32 a formar anillos que permiten la liberación de vesículas intraluminales (Alonso Y Adell et al., 2016; Henne et al., 2012; Saksena et al., 2009; Teis et al., 2008, 2010) (Figura 1.2A).

Si bien no se ha estudiado por completo como ESCRT-III remodela las membranas, se cree que los espirales de VPS32 polimerizados se convierten en resortes cargados debido a la compresión lateral inducida por filamentos vecinos de ESCRT-III u otras proteínas de membrana. La expansión de los resortes de VPS32 en la membrana, liberaría la tensión causando distorsiones en dicha membrana para impulsar las reacciones de gemación (Chiaruttini et al., 2015) (Figura 1.2B). Es muy probable que la unión de Vps4 a ESCRT-III no solo resulte en el desmontaje de la espiral, sino que también induzca cambios en ESCRT-III que estarían relacionados con en el paso final de escisión de la membrana. Es importante destacar que Vps4 puede inducir cambios en la conformación en los polímeros de ESCRT-III y la unión de Vps4 al subcomplejo Vps24-Vps2 da como resultado el agrupamiento de los filamentos (Ghazi-Tabatabai et al., 2008) (Figura 1.2B).



**Figura 1.2.** Ensamblaje de proteínas ESCRT que conducen a la remodelación de la membrana. **(A)** Las subunidades de ESCRT-III se homopolimerizan o copolimerizan en filamentos, anillos, espirales, hélices y estructuras tubulares con extremos en forma de domo. **(B)** El espiralado de oligómeros de ESCRT-III, carga y la actividad de la ATPasa de Vps4 podrían mediar la deformación y remodelación de membranas. Tomada de Alonso Y Adell *et al.*, 2016.



Como se ha señalado anteriormente, los estudios *in vivo* indican que Vps4 está presente durante el brote de la membrana mediado por ESCRT-III y es necesario para completar la escisión de la membrana (Baumgärtel et al., 2011; Elia et al., 2011; Jouvenet et al., 2011). En particular, la interacción de Vps4 con Vps2 y VPS32 podría inducir cambios conformacionales en la arquitectura de ESCRT-III, lo que a su vez impulsaría la constricción y escisión del cuello de la membrana (Adell et al., 2014; Wemmer et al., 2011).

### **El complejo ESCRT asociado a la biogénesis de VEs en parásitos protozoarios**

Los parásitos unicelulares utilizan vesículas extracelulares como vehículos para la comunicación intercelular y la manipulación del hospedador (Nievas et al., 2020). Si bien el proceso de biogénesis de las VEs en los parásitos protozoos aún no ha sido analizado en detalle, algunos estudios sugieren que el complejo ESCRT podría estar involucrado en la formación de VEs. Un estudio realizado en *P. falciparum* reveló la falta de la maquinaria ESCRT completa en este parásito, en particular de los subcomplejos ESCRT-0, -I y -II (Leung et al., 2008); sin embargo, a pesar de no haber podido identificar algunos miembros del complejo, la maquinaria ESCRT parecería ser funcional y mediar la producción de CMVs en dicho parásito (M. Yang et al., 2004). Además, se encontraron las proteínas PfVps32 y PfVps60 (proteínas del complejo ESCRT-III) y PfBro1 (un homólogo parasitario de la proteína humana Alix) en VEs derivadas de glóbulos rojos humanos infectados por *P. falciparum*, pero no en VEs derivadas de glóbulos rojos sin infectar (Avalos-Padilla et al., 2021). Aunque las tres proteínas se localizan en el citoplasma del parásito, PfVps32 y PfBro1 se exportan al citoplasma del glóbulo rojo, donde se sugiere que participan en la biogénesis y liberación de microvesículas (Avalos-Padilla et al., 2021). En concordancia, parásitos KO de PfVps60 secretaron menos VEs en comparación con sus contrapartes WT, lo que respalda la participación de PfVps60 en la biogénesis de VEs durante la infección por *P. falciparum* (Avalos-Padilla et al., 2021).

Un estudio filogenético del sistema ESCRT identificó varios homólogos de miembros de los complejos ESCRT-I, -II y -III en *T. brucei*, *L. major* y *T. cruzi*

(Leung et al., 2008), lo que indicaría que este sistema se encuentra conservado en parásitos *Kinetoplastidos* (Leung et al., 2008). El hallazgo de homólogos proteicos de la mayoría de los subcomplejos de ESCRT en estos parásitos sugiere que el complejo ESCRT sería completamente funcional en estos organismos y estar activo tanto en etapas extracelulares como intracelulares de la infección; lo que potencialmente los libera de una dependencia total del complejo ESCRT derivado del hospedador (Gioseffi et al., 2021). Miembros del complejo ESCRT en *Trypanosoma brucei* están involucrados en endocitosis (Silverman et al., 2013), degradación de proteínas ubiquitinizadas (Leung et al., 2008, 2011), reciclaje de proteínas de superficie y tráfico vesicular al endosoma (Leung et al., 2008; Silverman et al., 2013; Umaer & Bangs, 2020). Además, se sugirió que también estarían involucrados en la biogénesis de VEs (Dong et al., 2019; Eliaz et al., 2017; Rossi et al., 2021).

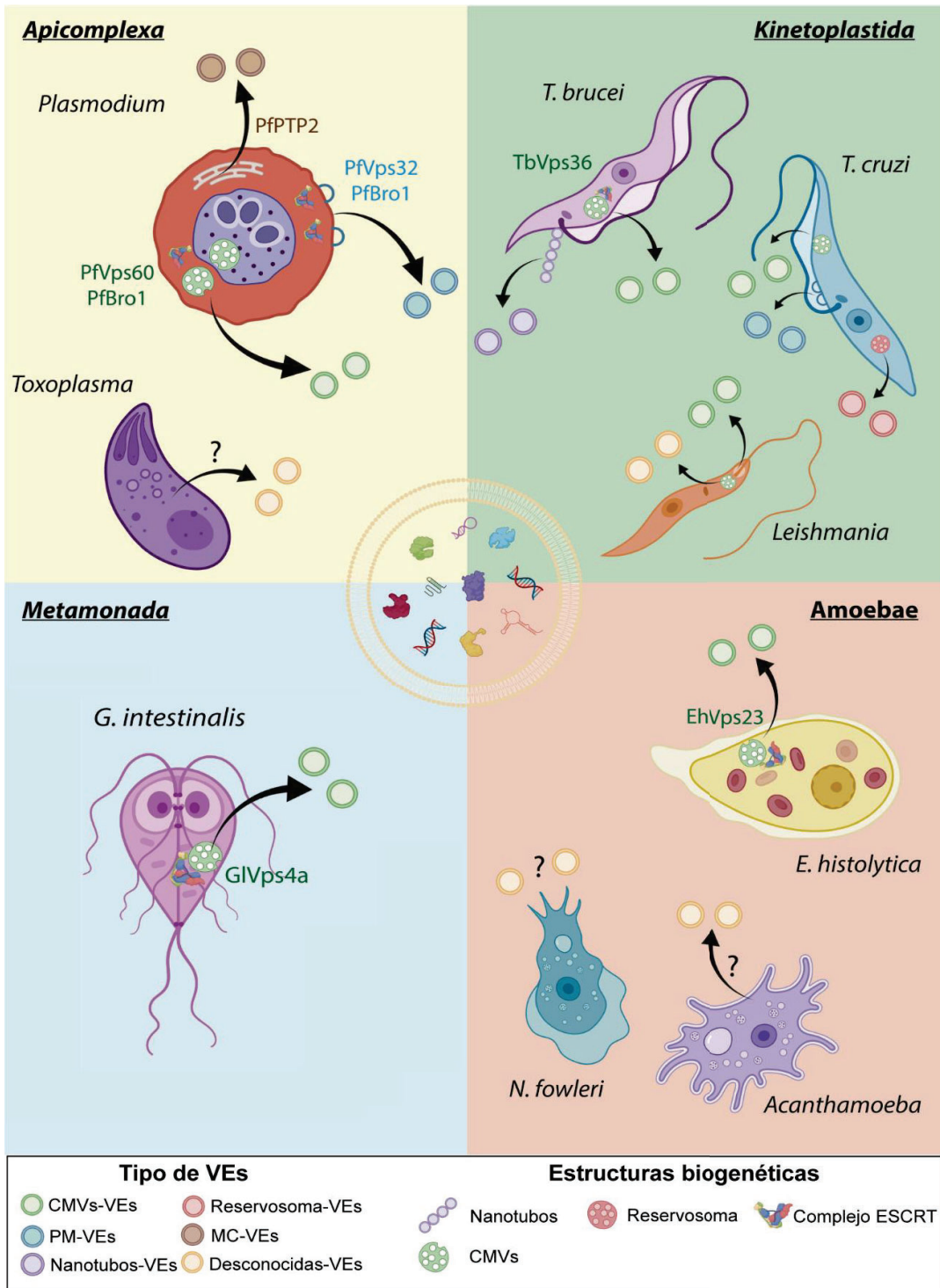
Estudios realizados en *E. histolytica* describieron que miembros del complejo ESCRT estaban involucrados en la regulación de la fagocitosis (Galindo et al., 2021, 2022), la formación de CMVs (Bañuelos et al., 2012) y el tráfico vesicular mediado por ubiquitina (Avalos-Padilla et al., 2018; Galindo et al., 2021, 2022). Es importante señalar que, si bien la biogénesis de VEs no se evaluó directamente, se determinó que EhVps23 estaba presente en los CMVs y en los exosomas secretados (Galindo et al., 2022; Sharma et al., 2020); lo que sugiere su conexión con la biogénesis de exosomas en *E. histolytica*. Curiosamente, trofozoítos que sobreexpresaban EhVps23 presentaron un aumento en el crecimiento, la fagocitosis, la migración y la formación de abscesos amebianos hepáticos *in vivo*, postulando a esta proteína como un importante factor de patogénesis (Galindo et al., 2022). En conjunto, estos datos señalan la participación de proteínas ESCRT en el tráfico vesicular de *E. histolytica* y, potencialmente, en la secreción de VEs.

*G. lamblia* posee un conjunto relativamente reducido de maquinaria ESCRT, ya que solo contiene en su genoma ortólogos para las proteínas Vps22 y Vps25 (ESCRT-II) (Saha et al., 2018), las proteínas Vps2 y Vps24 (ESCRT-III) (Leung et al., 2008; Saha et al., 2018), y Vps46 y la AAA-ATPasa Vps4 (Leung et al., 2008; Saha et al., 2018). Los parásitos transgénicos que expresan una proteína GIVps4a deficiente, mostraron una reducción en la formación de ILVs en el APV

y una disminución en la liberación de EIV en comparación con los parásitos WT (Moyano et al., 2019). Además, la sobreexpresión de GIVps4a produjo más ILVs, pero la cantidad de EIV producidas fue similar a la de la cepa WT; sugiriendo la participación de un mecanismo alternativo en la liberación de VEs, independiente de GIVps4a (Moyano et al., 2019).

*Tritrichomonas foetus* es un protozooario flagelado, emparentado filogenéticamente a *T. vaginalis*, que infecta el tracto genital bovino causando una infección de transmisión venérea (Rae & Crews, 2006) y el tracto gastrointestinal de los gatos domésticos en los cuales es agente causal de diarrea (Yao & Köster, 2015). La proteína VPS32 (un componente del complejo ESCRT-III) de *T. foetus* se localiza en vesículas intracelulares y se encuentra involucrada en la remodelación de la membrana durante la citocinesis celular (Iriarte et al., 2018). Además, se demostró, que la proteína VPS32 está presente en las vesículas extracelulares (específicamente en IVEs) que protruyen de las estructuras extra-axonemales (EASs), tanto en *T. foetus* como en *T. vaginalis* (Coceres et al., 2021). Las EASs proporcionan soporte mecánico y regulan el movimiento flagelar. También se observó que el porcentaje de células con IVEs en las EASs aumentaron en los parásitos que sobreexpresaban la proteína VPS32 (Coceres et al., 2021).

Teniendo en cuenta la importancia de las VEs en la infección por *T. vaginalis* (Nievas et al., 2018; Olmos-Ortiz et al., 2017; Twu et al., 2013), la presencia de VPS32 en vesículas intracelulares de *T. foetus* (Iriarte et al., 2018) y en IVEs en los flagelos de *T. vaginalis* (Coceres et al., 2021) y la importancia de los componentes del complejo ESCRT en la biogénesis de VEs en otros protozoos (Figura 1.3), nos propusimos estudiar el rol de la proteína VPS32 en la biogénesis de las VEs liberadas por *T. vaginalis*.



**Figura 1.3.** Resumen de la biogénesis de las vesículas extracelulares y la participación de las proteínas ESCRT en protozoos parásitos de humanos. El diagrama representa el conocimiento actual sobre los mecanismos de biogénesis de VEs en los protozoos parásitos más estudiados, organizados por proximidad taxonómica y clínica: *Apicomplexa*, *Kinetoplastida*, *Metamonadas* y amebas. Tomada de Camacho *et al.*, 2023.

### 1.3. Objetivos específicos

La proteína VPS32 es un miembro clave del complejo ESCRT-III (subunidad III del complejo endosomal requerido para el transporte); el cual posee un rol clave como efector en el proceso de escisión de las membranas celulares. Teniendo en cuenta que la escisión de las membranas es un paso determinante para la formación y liberación de las VEs, nosotros hipotetizamos que la proteína VPS32 de *Trichomonas vaginalis* podría estar regulando la biogénesis de VEs (tanto exosomas como microvesículas). En este contexto planteamos los siguientes objetivos específicos:

**1. Evaluar la localización de la proteína VPS32 en los parásitos y en VEs aisladas.** Nuestra hipótesis de trabajo plantea que la proteína VPS32 estaría involucrada en la biogénesis de VEs liberadas por *T. vaginalis*, por lo que evaluaremos por medio de microscopía electrónica si dicha proteína se localiza en estructuras relacionadas con la formación de VEs y/o en VEs aisladas.

**2. Estudiar el rol de la proteína en la biogénesis de las VEs y en el proceso de interacción con las células hospedadoras.** Si detectamos a la proteína VPS32 en estructuras asociadas a la biogénesis de VEs, evaluaremos el posible rol de dicha proteína en la regulación de la biogénesis de VEs. Para esto, utilizaremos microscopía electrónica, Western Blot con anticuerpos específicos de proteínas de VEs y análisis por seguimiento de nanopartículas (NTA), para cuantificar la cantidad de VEs liberadas por parásitos que sobreexpresan Vps32 en comparación con parásitos control. Teniendo en cuenta que las VEs de *T. vaginalis* regulan la adherencia al hospedador, evaluaremos si parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32 presentan mayor adherencia a las células hospedadoras mediante ensayos de adherencia a células prostáticas.

**3. Examinar el contenido proteico de las VEs liberadas por parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32.** Nuestra hipótesis plantea que la proteína VPS32 podría tener un rol no solo en regular la cantidad sino también en regular el contenido de las VEs. En este contexto, evaluaremos si existen diferencias en el contenido proteico de las VEs liberadas por los parásitos que sobreexpresan

la proteína VPS32 con respecto a los parásitos control; mediante un análisis de LC-MS/MS de VEs aisladas.

## 1.4. Metodología

### 1.4.1. Cultivo de parásitos

La cepa salvaje G3 de *Trichomonas vaginalis* (ATCC PARA-98; Kent, UK) fue cultivada en condiciones de microaerofilia en medio TYM (triptosa, extracto de levadura y maltosa) suplementado con 10% de suero fetal equino (SFE; Internegocios, Argentina) y 10 U/ml de penicilina (Invitrogen) (Clark & Diamond, 2002) y a 37 °C hasta llegar a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/ml; y fueron subcultivados diariamente.

### 1.4.2. Transfección de parásitos

Parásitos salvajes de la cepa G3 fueron transfectados con el gen que codifica para la proteína VPS32 (TVAG\_459530). Para esto, el marco abierto de lectura del gen de VPS32 fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores:

Forward (5'-3'): AAACATATGATGAGCTGGTTATGGGGTAAGAAGAAG

Reverse (5'-3'): TTTGGTACCATCATGGCTCAGTTCGGTGGTATC

Una vez obtenido el fragmento de PCR, se digirió dicho fragmento utilizando las enzimas de restricción KpnI y NdeI (presentes en los cebadores) y se clonó dicho fragmento en el plásmido MasterNeo-(HA) (Delgadillo et al., 1997); el cual contiene el gen de neomicina fosfotransferasa (Neo) que permite su selección con el antibiótico Geneticina (G418). El vector utilizado permite la expresión del gen fusionado a una etiqueta de HA en su porción C-terminal bajo el control de un promotor fuerte ( $\alpha$ -SCS) (Delgadillo et al., 1997). Los parásitos de la cepa G3 de *T. vaginalis* se transfectaron con los plásmidos MasterNeo conteniendo el gen de VPS32 (TvVPS32) y en paralelo se realizó la transfección con el plásmido pMasterNeo vacío (TvEpNeo) para ser utilizado como control negativo en los experimentos. La transfección se llevó a cabo mediante electroporación con 25-50  $\mu$ g de ADN plasmídico circular utilizando 450 volts y 960 mFd en cubetas de 0,4 cm (Biorad). Los parásitos que incorporaron el plásmido de manera exitosa fueron seleccionados con 100  $\mu$ g/ml de G418.

### **1.4.3. Cultivo de células NHrPE1**

Las células de próstata humana NHPrE1, fueron cedidas gentilmente por el Dr. Simon Hayward (NorthShore University, USA) (Jiang et al., 2010). Se crecieron en botellas de cultivo celular T25 y T75 en medio DMEM/F12 (50/50), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB; Internegocios, Argentina) , 1% de insulina-transferrina-selenio (Gibco), 0.4% de extracto pituitario bovino (Hammond Cell Tech, Windsor, CA), 1:1000 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Sigma-Aldrich) y 10 U/ml de penicilina y cultivadas a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> (Jiang et al., 2010).

Para los ensayos de interacción con parásitos y con vesículas extracelulares, las células de próstata humana fueron crecidas en cubreobjetos de vidrio dentro de placas de 24 pocillos hasta lograr un 100% de confluencia.

### **1.4.4. Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

- **Tinción negativa de VEs**

Las muestras de VEs fueron fijadas con 2.5% de glutaraldehído en una solución tampón de cacodilato 0.1 M, pH 7.2. Luego, las muestras se depositaron en rejillas de níquel revestidas de carbón, se realizó una descarga luminiscente durante 5 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron negativamente con aurotioglucosa 1% (estándar de referencia UPS) en agua durante 5 segundos. Las muestras se secaron al aire y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G2 Spirit operando a 120 kV. Las imágenes se adquirieron de manera aleatoria con un sistema de cámara CCD (MegaView G2, Olympus, Alemania).

- **Inmunoelectromicroscopía: marcaje por tinción negativa de las VEs**

Las muestras de VEs fueron depositadas en rejillas de níquel revestidas de carbón y se expusieron a una descarga luminiscente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se fijaron con una solución compuesta por paraformaldehído (PAF) 4%, glutaraldehído 0.5% en tampón cacodilato 0.1 M (pH 7.2) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguido, se realizaron lavados con la solución PBS y se incubaron con anticuerpos anti-HA (1:1000) y partículas de



oro de un tamaño de 10 nm conjugadas a un anticuerpo secundario anti-ratón. Las muestras se lavaron con agua, se tiñeron negativamente con aurotioglucosa 1% y se observaron cómo se describió previamente. Como control negativo se utilizaron las partículas de oro conjugadas con el anticuerpo secundario anti-ratón.

#### **1.4.5. Aislamiento de VEs**

Los aislamientos de VEs se realizaron siguiendo un protocolo puesto a punto previamente en nuestro laboratorio (Nievas et al., 2018) con algunas modificaciones. Los parásitos TvEpNEO y TvVPS32 se mantuvieron en medio de cultivo hasta alcanzar una densidad de  $1 \times 10^6$  parásitos/ml. Los cultivos crecidos se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos y los parásitos fueron resuspendidos en medio TYM sin suero (para evitar la interferencia de las vesículas extracelulares provenientes del suero) e incubados por 4 horas a 37 °C para permitir la liberación de VEs. Una vez terminada la incubación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante fue luego filtrado utilizando una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.8  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich) que permitió eliminar los restos celulares. Luego, el medio condicionado filtrado se centrifugó a 100.000 x g por 90 minutos para obtener un pellet enriquecido en VEs (mezcla de MVs y exosomas) (Figura 1.6).

Alternativamente, para obtener muestras enriquecidas en MVs y/o exosomas, luego de las 4 horas de incubación y posterior filtrado con membrana de 0.8  $\mu\text{m}$ , la muestra se sometió a centrifugaciones diferenciales. Específicamente, el medio filtrado se centrifugó a 10.000x g por 90 minutos para obtener un pellet enriquecido en VEs grandes (principalmente MVs) y el sobrenadante obtenido se centrifugó por 90 minutos a 100.000x g para obtener un pellet enriquecido en VEs pequeñas (mayoritariamente exosomas). Los pellets obtenidos en todos los casos fueron resuspendidos en 20  $\mu\text{l}$  de PBS + 2X de una mezcla de inhibidores de proteasas (complete™ ULTRA Tablets, Mini, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail, Sigma).

#### **1.4.6. SDS-PAGE y Western Blot**

Los lisados de VEs fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) 12% y fueron electrotransferidas en membranas de PVDF (GE Healthcare, Life Science). Las membranas fueron bloqueadas en leche en polvo al 5% (p/v) en solución tampón Tris con detergente Tween 20% (TBS-T) al 0,05% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, fueron incubadas toda la noche a 4 °C con distintos anticuerpos primarios generados en conejos: anti-MIF (1:500), anti-TCTP (1:500), anti-TSP1 (1:500) y anti-Hmp33 (1:500). Terminada la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con solución tampón TBS-T y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina para luego ser visualizado utilizando el sistema NBT/BCIP (Roche).

#### **1.4.7. Cuantificación de proteínas totales**

La concentración de proteína total de las muestras de VEs aisladas fue determinada colorimétricamente utilizando el reactivo de Bradford (Sigma). La curva estándar fue preparada utilizando albúmina de suero bovino (Promega). Las absorbancias de las muestras fueron medidas utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

#### **1.4.8. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)**

Las VEs liberadas por TvEpNEO y TvVPS32 fueron cuantificadas utilizando la técnica de Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, Nanosight, Malvern, U.K.). Las muestras fueron diluidas en PBS 1:100 y se analizaron en el equipo NS300 Nanosight. Cada muestra se analizó por triplicado utilizando videos de 60 segundos a 10 cuadros/segundo a temperatura ambiente con los siguientes parámetros: obturador de la cámara -1492, ganancia de la cámara - 512, umbral de detección -10.

#### **1.4.9. Marcación de VEs**

Las VEs aisladas (10 µg) se marcaron con 4 µl de reactivo fluorescente PKH67 (Sigma) en 1 ml de Diluyente C por 5 minutos a temperatura ambiente. Como control se marcó en paralelo el mismo volumen de PBS (solución tampón donde fueron resuspendidas las VEs aisladas) con PKH67 (PKH67-PBS). Luego del marcaje, se utilizaron Amicon de filtro 10 kDa (Milipore) para eliminar el PKH67 no unido a VEs.

#### **1.4.10. Ensayos de interacción de VEs con células prostáticas**

Para evaluar la capacidad de interacción de las VEs con las células de próstata, 10 µg de VEs marcadas con PKH67 o un volumen equivalente del control PKH67-PBS fueron incubadas con una monocapa confluyente de células de próstata durante 3 horas a 37 °C. Para discriminar si las VEs interactuaban o eran internalizadas por las células del hospedador, realizamos en paralelo la incubación de 10 µg de VEs marcadas con PKH67 con las células de próstata durante 3 horas a 4 °C. Luego, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con PAF 4% durante 15 minutos. Los núcleos de dichas células fueron marcados con DAPI (Sigma). La interacción se evaluó mediante un análisis de intensidad de fluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axio Observer 7 (Zeiss). Para realizar una correcta comparación, todas las imágenes se adquirieron con el mismo tiempo de exposición, brillo y contraste.

Alternativamente, la capacidad de interacción de las VEs con las células de próstata fue analizada utilizando citometría de flujo. En este caso, 10 µg de VEs o el mismo volumen del control PKH67-PBS se incubaron con  $1 \times 10^6$  células de próstata durante 45 minutos. Luego de lavar con PBS para eliminar las VEs no unidas se analizó la capacidad de interacción de las distintas poblaciones de VEs utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences). Los datos obtenidos fueron analizados con el software FlowJo.

#### **1.4.11. Ensayos de adherencia de *T. vaginalis* a células del hospedador**

Con el objetivo de evaluar la capacidad de adherencia de los parásitos a las células de próstata, los parásitos fueron marcados con CellTracker Blue CMAC

(Invitrogen) y se incubaron durante 30 minutos con una monocapa de células de próstata en una relación 3:1 parásitos: células prostáticas, respectivamente. Transcurrido ese tiempo, se realizó un lavado con PBS para remover los parásitos no adheridos y se fijó la muestra con paraformaldehído 4%. Por último, se montaron las muestras con Fluoromont (Sigma) y se visualizaron con el microscopio invertido Zeiss Axio Observer 7 (Zeiss). La cuantificación se realizó con el programa ImageJ, contando los parásitos adheridos a la monocapa de células/campo.

#### **1.4.12. Identificación de las proteínas presentes en las VEs mediante espectrometría de masa**

Con el objetivo de analizar la identidad y abundancia de las proteínas presentes en las VEs aisladas de parásitos TvEpNEO y TvVPS32, las distintas poblaciones de VEs aisladas fueron analizadas utilizando LC-MS/MS. Para poder realizar un análisis comparativo de abundancia, la misma concentración de VEs aisladas de parásitos TvEpNEO y TvVPS32 fueron analizadas. Para esto, las muestras fueron resuspendidas en un volumen mínimo de solución de tampón de digestión (Tris-HCl 100mM, pH 8 y urea 8 M), reducidas y alquiladas mediante la adición secuencial de una solución 5 mM tris (2-carboxietil) fosfina y una solución 10 mM de yodoacetamida. Luego, las muestras fueron luego digeridas por Lys-C (Princeton Separations) y tripsina proteasas (Promega) (Florens et al., 2006). En primer lugar, se añadió proteasa Lys-C [ $\approx$  1:50 (p/p) relación de enzima: sustrato] a cada muestra y se incubó durante 4 horas a 37 °C con agitación suave. Luego, las muestras digeridas se diluyeron hasta 2 M de urea agregando solución tampón sin urea, se agregó tripsina en una relación final enzima: sustrato de 1:20 (p/p) y se incubó durante 8 horas a 37 °C con agitación suave. Las digestiones se detuvieron mediante la adición de ácido fórmico a una concentración final de 5% p/v. Los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente de la resina y se analizaron utilizando una plataforma LC-MS/MS (Kaiser & Wohlschlegel, 2005; Wohlschlegel, 2009) utilizando una columna capilar de sílice fundida con una punta de electropulverizador de 5  $\mu$ m y se empacaron con 18 cm de partículas Luna C18 3  $\mu$ m (Phenomenex) con un espectrómetro de masas Q-exactivo (Thermo Fisher). Los péptidos se fraccionaron usando un gradiente de

acetonitrilo creciente y se eluyeron directamente en el espectrómetro de masas, donde se recogieron los espectros MS/MS. La estrategia de adquisición de datos dependiente de los espectros consistió en la repetición de un ciclo de un espectro MS completo (Resolución= 70000) seguido de los MS/MS de los 12 precursores iónicos más intensos del escaneo MS completo (Resolución= 17500) (Kelstrup et al., 2012). Los datos crudos se obtuvieron junto con espectros de emisión, los cuales se analizaron utilizando el software MaxQuant (Tyanova et al., 2016). Para poder identificar las proteínas presentes en las muestras, se realizó una búsqueda bioinformática utilizando una base de datos de proteínas predichas en TrichDB (Aurrecochea et al., 2009). Para dicha búsqueda, se utilizaron los siguientes parámetros: (1) tolerancia al ion precursor de 20 ppm; (2) tolerancia a los iones de fragmentos de 20 ppm; (3) la carbamidometilación de cisteína se consideró como una modificación estática; (4) los péptidos debían ser completamente trípticos; y (5) no se tuvieron en cuenta las escisiones omitidas. Las tasas de falsos positivos para las identificaciones de péptidos se estimaron utilizando un enfoque de base de datos trampa y luego se filtraron utilizando el algoritmo DTASelect (Cociorva et al., 2006; Elias & Gygi, 2007; Tabb et al., 2002). Se consideró que las proteínas identificadas por al menos dos péptidos únicos completamente trípticos, cada uno con una tasa de falsos positivos de menos del 5%, estaban presentes en la muestra. Tres conjuntos diferentes de muestras se analizaron de forma independiente. Las proteínas presentes en la VEs se identificaron mediante la herramienta BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineación local) y se clasificaron mediante el enriquecimiento del término GO de acuerdo con el sistema de clasificación PANTHER (Mi et al., 2013).

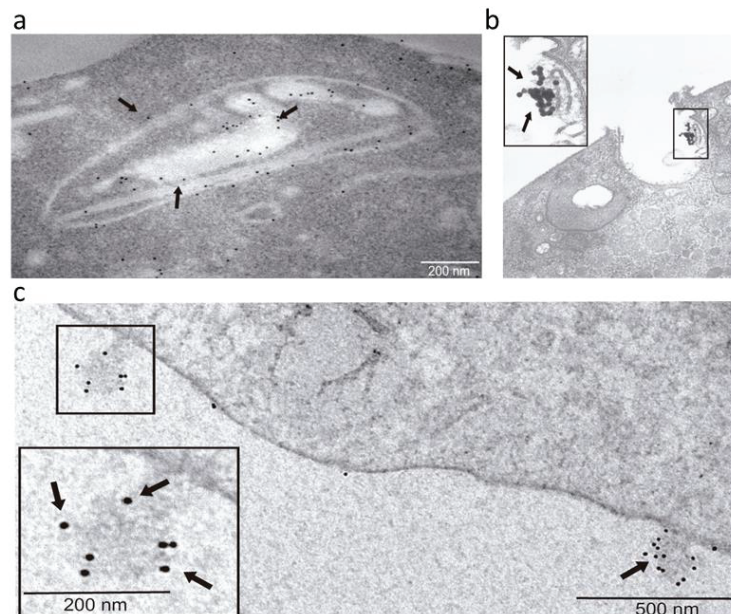
#### **1.4.13. Análisis estadísticos y gráficos**

Las consideraciones estadísticas específicas y las pruebas utilizadas se describen por separado para cada subsección. Para los gráficos se utilizaron GraphPad Prism para Windows versión 8.00 y RStudio versión 4.0.5 (<http://www.R-project.org>). Los datos se representan como media  $\pm$  desvío estándar (DE). La significancia se estableció en  $p < 0.05$ . Para los análisis estadísticos se utilizó el software InfoStat versión 2020e.

## 1.5. Resultados

### 1.5.1. La proteína VPS32 se localiza en las VEs liberadas por el parásito *Trichomonas vaginalis*

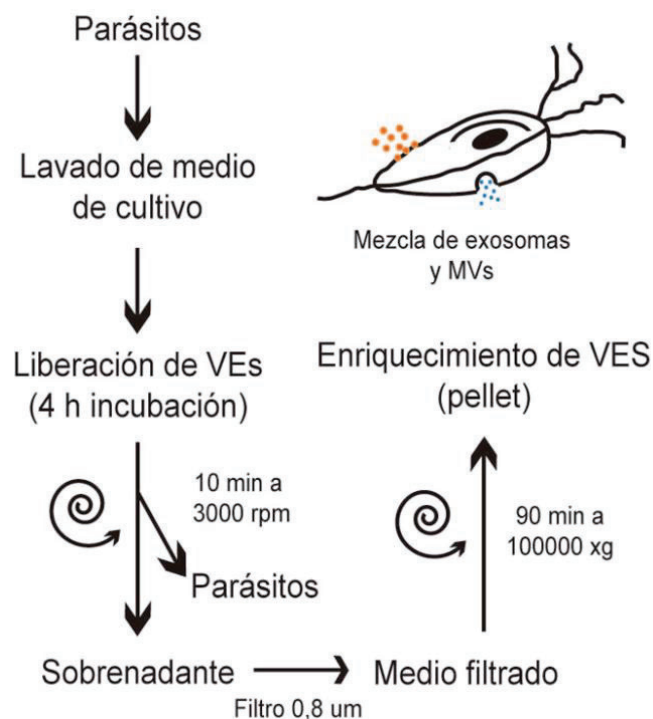
Nuestra hipótesis de trabajo plantea que el complejo ESCRT podría ser importante para regular la biogénesis de VEs en *T. vaginalis*. Específicamente, proponemos que la proteína VPS32, miembro del complejo ESCRTIII, podría ser clave en la regulación de este proceso. En este contexto, inicialmente evaluamos si TvVPS32 se encontraba presente en las VEs liberadas por este parásito. Para esto, parásitos de la cepa salvaje G3 fueron transfectados con un plásmido conteniendo la secuencia del gen que codifica para la proteína VPS32 bajo el control de un promotor fuerte ( $\alpha$ -SCS) fusionada a una etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo C-terminal (Delgadillo et al., 1997) (denominados parásitos TvVPS32 a lo largo de esta tesis). Inicialmente, realizamos una inmunoelectromicroscopía utilizando parásitos TvVPS32 y anticuerpos anti-HA conjugados con nanopartículas de oro. Como se puede observar en la Figura 1.5 la proteína se localiza en los cuerpos multivesiculares (Figura 1.5a), así como también en MVs que protruyen de la superficie celular (Figura 1.5c) y en VEs que se encontraban en proceso de exo- o endocitosis (Figura 1.5b).



**Figura 1.5. La proteína VPS32 se localiza en estructuras relacionadas al tráfico vesicular.** La localización subcelular de la proteína VPS32 fue analizada por medio de

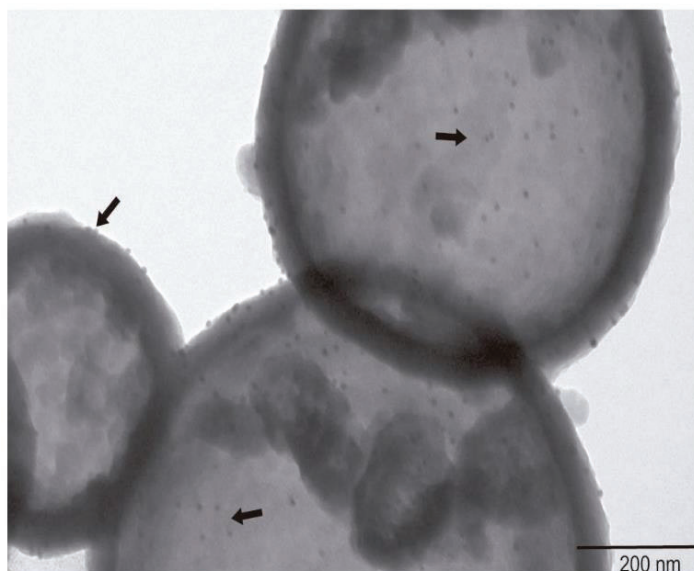
inmuno-electromicroscopía utilizando parásitos que sobreexpresan la proteína TvVPS32 fusionada a una etiqueta de hemaglutinina (HA) y un anticuerpo anti-HA. Se puede observar la presencia de TvVPS32 en cuerpos multivesiculares (a), VEs que se encontraban en exo- o endocitosis (b) y microvesículas que protruyen de la membrana del parásito (c). Las flechas negras indican donde se localiza la proteína VPS32.

Teniendo en cuenta la localización subcelular de TvVPS32 en estructuras asociadas a la biogénesis de VEs, decidimos evaluar si VPS32 se encontraba localizada en las VEs secretadas. Realizamos un aislamiento de VEs de los parásitos TvVPS32 utilizando un protocolo optimizado en nuestro laboratorio (Nievas et al., 2018), pero con algunas modificaciones (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Protocolo de aislamiento de VEs.

Cabe destacar que el protocolo utilizado se basa en un aislamiento de VEs según tamaño (las muestras estarán enriquecidas en VEs de tamaño menor a 0.8 µm) y por ende las muestras obtenidas contienen una mezcla de exosomas y MVs. Posteriormente demostramos mediante un análisis de inmuno-electromicroscopía utilizando un anticuerpo anti-HA que la proteína VPS32 se encontraba presente en las VEs liberadas por *T. vaginalis* (Figura 1.7).



**Figura 1.7. La proteína VPS32 se encuentra presente en VEs aisladas.** Mediante un análisis de inmunoelectromicroscopía utilizando un anticuerpo anti-HA se puede observar que la proteína VPS32 se localiza en VEs aisladas de los parásitos TvVPS32 (flechas negras).

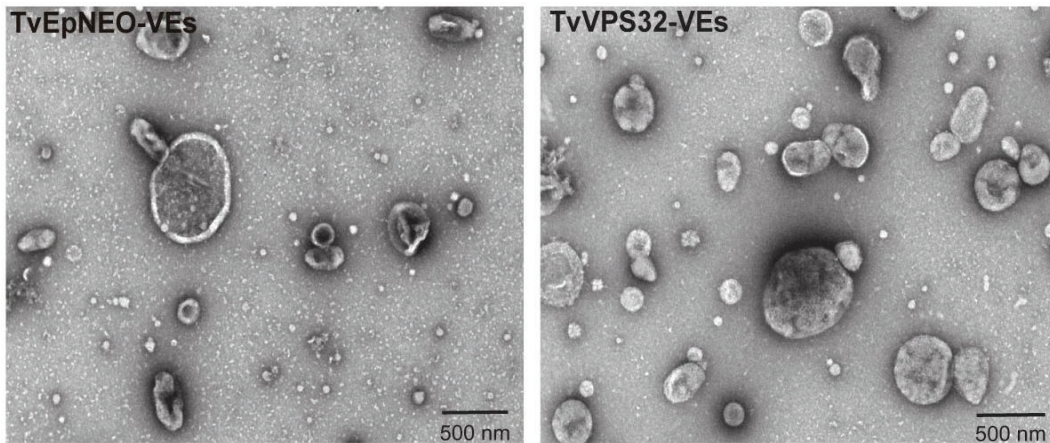
Teniendo en cuenta la localización subcelular de TvVPS32, así como también su presencia en VEs liberadas, hipotetizamos que dicha proteína podría estar involucrada en la formación de las VEs.

### **1.5.2. La proteína VPS32 modula la secreción de VEs**

Para evaluar si la proteína VPS32 estaba involucrada en la biogénesis de las VEs, utilizamos métodos alternativos y complementarios que nos permitieran demostrar si los parásitos TvVPS32 liberaban mayor cantidad de VEs que los parásitos transfectados con un plásmido vacío control (parásitos TvEpNEO). Para comparar la abundancia de las VEs liberadas, es importante destacar que las VEs fueron aisladas a partir del mismo número de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO ( $1 \times 10^8$  células) y las muestras obtenidas fueron resuspendidas en el mismo volumen final (300  $\mu$ l de PBS). Inicialmente, las muestras de VEs aisladas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB). Mediante el uso de esta técnica inicialmente pudimos observar diferencias cualitativas en la cantidad de VEs aisladas (Figura 1.8): las muestras obtenidas a partir de



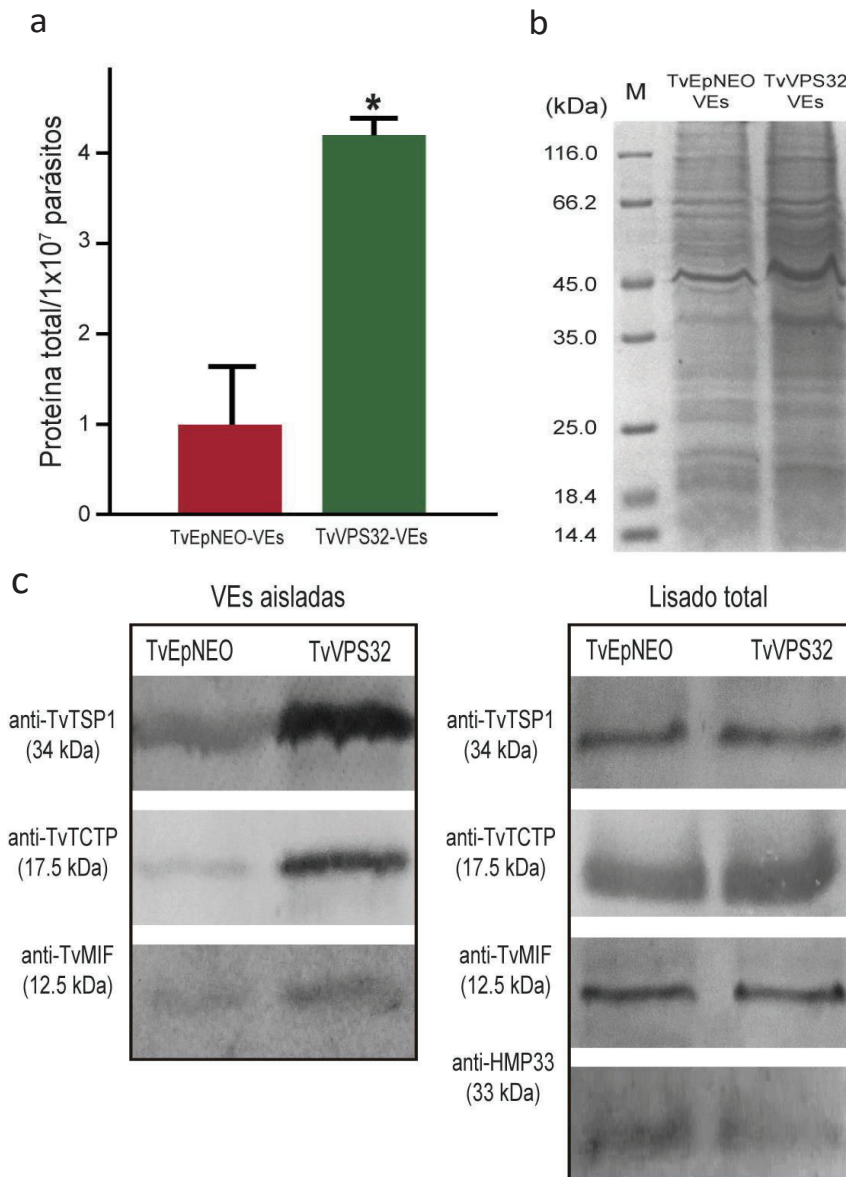
parásitos TvVPS32 contenían mayor cantidad de VEs por campo que la muestra obtenida a partir de parásitos TvEpNEO.



**Figura 1.8. Los parásitos TvVPS32 liberan mayor cantidad de VEs que los parásitos TvEpNEO.** Utilizando microscopía electrónica de barrido se puede observar que las muestras obtenidas de los parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32 contienen mayor cantidad de VEs aisladas.

Como método alternativo para evaluar la abundancia de VEs, cuantificamos las proteínas totales presente en cada muestra utilizando el método de Bradford (Figura 1.9a). Si bien el resultado obtenido solo es una medida indirecta, las muestras de VEs aisladas de parásitos TvVPS32 contenían  $\approx 4$  veces más proteínas totales que las muestras obtenidas de los parásitos TvEpNEO. De manera similar, cuando evaluamos el perfil de proteínas totales sembrando el mismo volumen de muestra de VEs aisladas de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO en un gel SDS-PAGE, pudimos observar al teñir el gel con Comassie blue que las muestras obtenidas a partir de los parásitos TvVPS32 contenían mayor cantidad de proteínas que los parásitos control (Figura 1.9b). Para evaluar si las diferencias observadas en la abundancia de proteínas entre las muestras se debía a un aumento en las VEs liberadas o a una mayor carga de proteínas dentro de las VEs, realizamos un ensayo de Western blot utilizando anticuerpos específicos generados contra proteínas presentes en las VEs de *T. vaginalis* (TvTSP1, TvMIF y TvTCTP); las cuales están presentes en los proteomas publicados tanto de exosomas (Twu et al., 2013) como de MVs (Nievas et al., 2018). Para ello, realizamos un ensayo de Western Blot con anticuerpos específicos para detectar una proteína integral de membrana (TvTSP1) y dos proteínas citosólicas (TvMIF y TvTCTP) presentes en VEs aisladas (Figura 1.9c)

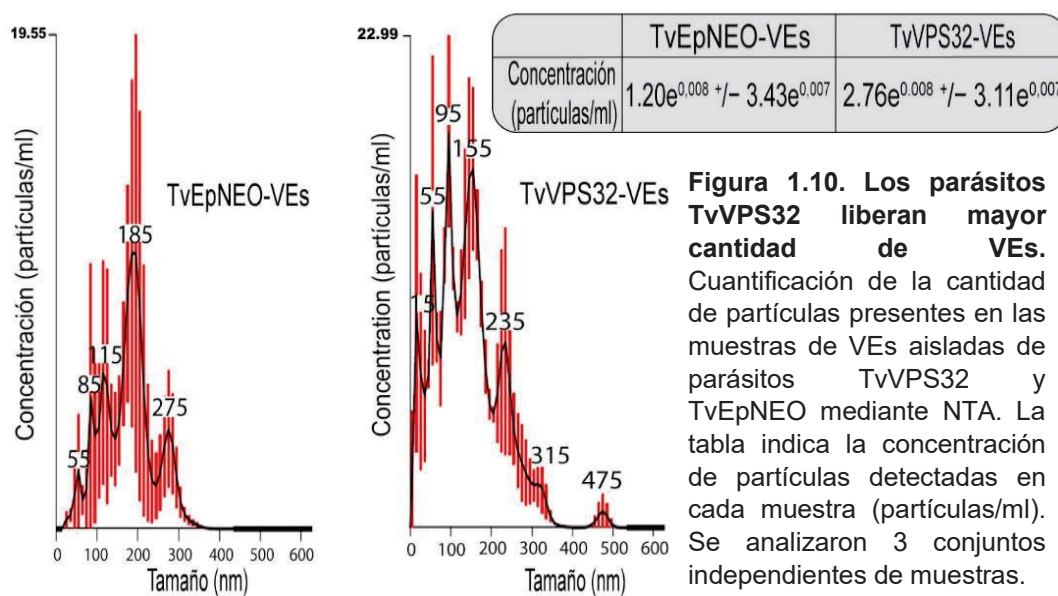
utilizando el mismo volumen de muestra, lisados totales de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO como controles. Si bien la abundancia de TvTSP1, TvTCTP y TvMIF detectada en los lisados de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO es comparable, las tres proteínas analizadas presentan mayor señal en las muestras de VEs aisladas de TvVPS32 que en las muestras aisladas de TvEpNEO. Estos resultados, utilizando técnicas complementarias, sugieren que los parásitos TvVPS32 liberan mayor cantidad de VEs que los parásitos TvEpNEO.



**Figura 1.9. Los aislamientos de VEs de los parásitos TvVPS32 poseen mayores cantidades de proteínas que las VEs aisladas de EpNEO. (a)** Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford indica que las muestras aisladas de parásitos TvVPS32 poseen mayor cantidad de proteínas. Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la

diferencia significativa entre 3 tratamientos independientes (\*p<0.05). **(b)** Perfil electroforético de proteínas presentes en las muestras de VEs aisladas de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO. Cabe destacar que el mismo volumen de muestra fue sembrado en cada pocillo. **(c)** Análisis de Western blot para evaluar la presencia de tres proteínas conocidas presentes en VEs de *T. vaginalis* (TvTSP1, TvMIF y TvTCTP). Se sembró el mismo volumen de muestra obtenida a partir de la misma cantidad de parásitos iniciales. La proteína HMP33 (proteína de hidrogenosomas) se utilizó como control de carga. Se muestra un experimento representativo de 3.

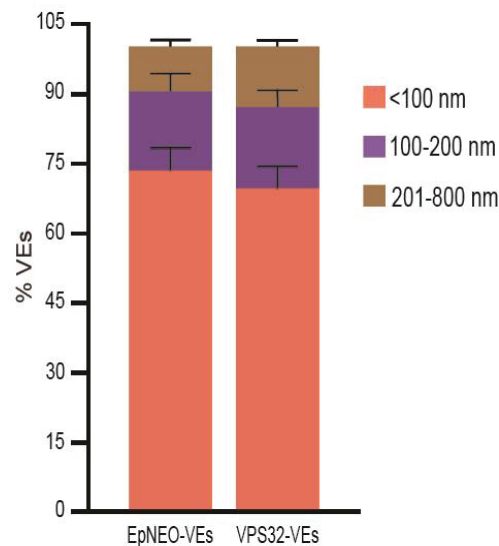
Considerando que los métodos hasta acá utilizados son métodos cualitativos o semi-cuantitativos, para cuantificar de forma precisa el aumento de VEs liberadas realizamos un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), método de referencia comúnmente utilizado para cuantificar VEs. El análisis de NTA reveló que las muestras aisladas de los parásitos TvVPS32 poseían mayor cantidad de VEs ( $\approx 2.3$  veces) que las muestras obtenidas parásitos TvEpNEO (Figura 1.10).



**Figura 1.10. Los parásitos TvVPS32 liberan mayor cantidad de VEs.** Cuantificación de la cantidad de partículas presentes en las muestras de VEs aisladas de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO mediante NTA. La tabla indica la concentración de partículas detectadas en cada muestra (partículas/ml). Se analizaron 3 conjuntos independientes de muestras.

En base a los resultados obtenidos, luego evaluamos si la proteína TvVPS32 afectaba específicamente la secreción de exosomas, MVs o ambas poblaciones de VEs. Inicialmente analizamos el tamaño de las VEs aisladas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) y como se puede observar en la Figura 1.11, las VEs liberadas por los parásitos TvVPS32 tenían un tamaño y morfología similares a las VEs secretadas por los parásitos control TvEpNEO (Figura 1.11). Estos resultados estarían indicando que la proteína TvVPS32 parecería estar

afectando tanto la liberación de MVs como de exosomas en el parásito *T. vaginalis*.

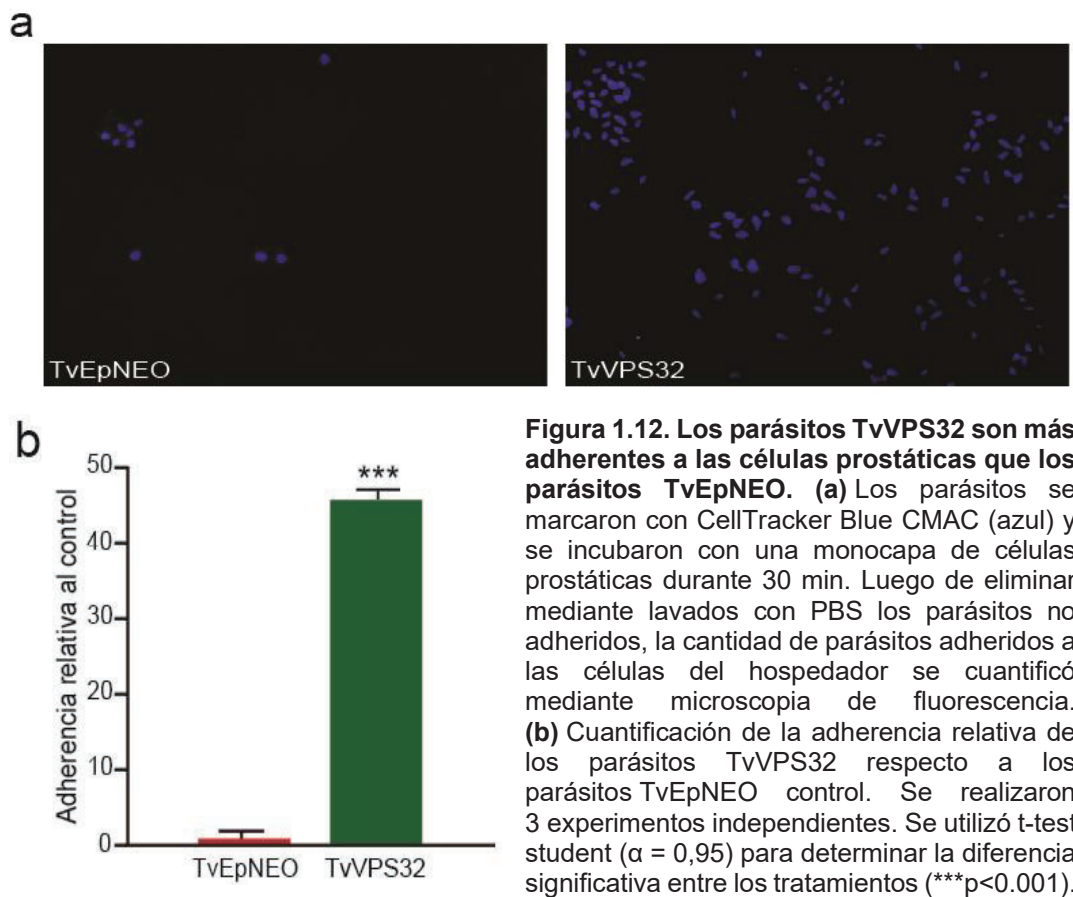


**Figura 1.11. La proteína VPS32 afecta la liberación de todas las poblaciones de VEs.** Utilizando microscopía electrónica de barrido, se analizó el tamaño de 500 VEs al azar de los parásitos TvEpNEO y TvVPS32. Se separaron en 3 rangos distintos de tamaño y se graficó el porcentaje encontrado de cada población.

### 1.5.3. La proteína VPS32 contribuye al incremento de la adherencia del parásito a la célula hospedadora

Como se ha descrito previamente el éxito de la infección parasitaria depende, al menos en parte, de la capacidad del parásito para adherirse a la célula hospedadora (Mercer & Johnson, 2018). Por ende, identificar los distintos actores involucrados en este proceso multifactorial es importante para comprender el proceso de patogénesis (de Miguel et al., 2010; dos Santos et al., 2015). Específicamente, trabajos realizados por nuestro grupo y por otros laboratorios durante los últimos años han demostrado que las VEs son factores claves en el proceso de adherencia (Twu et al., 2013). Considerando que demostramos previamente que dicha proteína regula la biogénesis de las VEs, sería lógico suponer que la proteína VPS32 podría estar involucrada en la modulación de la adherencia del parásito a la célula hospedadora. Para evaluar esta hipótesis, examinamos la capacidad de adherencia de los parásitos TvEpNEO y TvVPS32 utilizando un protocolo puesto a punto en nuestro

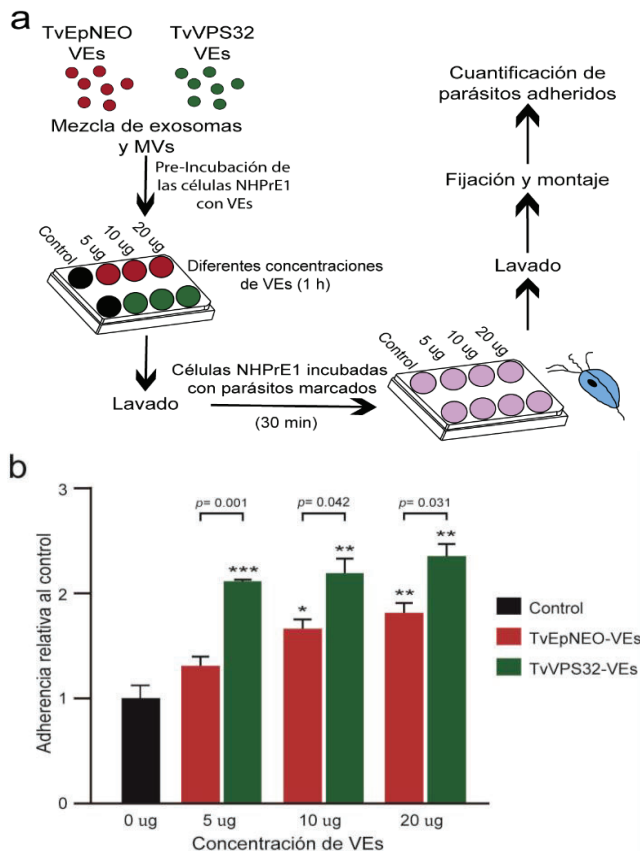
laboratorio (Twu et al., 2013). Brevemente, los parásitos fueron marcados con el fluoróforo intracelular CellTracker Blue e incubados con una monocapa de células prostáticas durante 30 minutos. Luego de realizar lavados para eliminar los parásitos no adheridos, la cantidad de parásitos adheridos a las células del hospedador se cuantificaron mediante microscopia de fluorescencia (Figuras 1.12a y 1.12b). Sorprendentemente, nuestros resultados indican que los parásitos TvVPS32 se adhirieron aproximadamente 33 veces más a las células de próstata que los parásitos control. Este hallazgo sugiere que la proteína VPS32 puede desempeñar un rol relevante en la modulación de la adherencia del parásito a la célula hospedadora.



#### 1.5.4. Las VEs de TvVPS32 modulan, al menos en parte, el aumento de la adherencia de los parásitos a las células hospedadoras

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de VPS32 contribuye a regular el proceso de adherencia de *T. vaginalis* a las células del hospedador; así como también tendría un rol en la liberación de VEs. Para evaluar si la

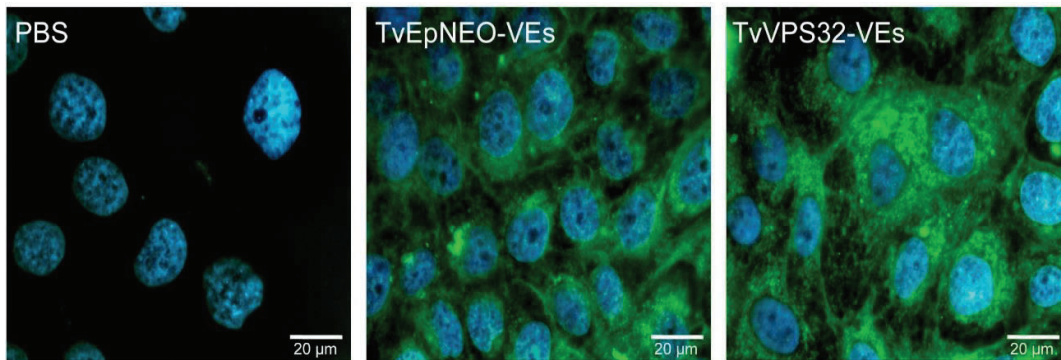
regulación del proceso de adherencia a las células hospedadoras estaba mediada por la liberación de VEs de los parásitos TvVPS32, evaluamos si la preincubación con VEs aisladas de parásitos TvVPS32 o TvEpNEO aumentaba diferencialmente la adherencia de los parásitos salvajes a células prostáticas NHPRE1 (Figura 1.13). Las células prostáticas NHPRE1 fueron preincubadas con distintas cantidades de VEs aisladas de parásitos TvVPS32 o TvEpNEO como se describe en la figura 1.13a; y nuestros resultados indican que si bien la preincubación con VEs aisladas de TvVPS32 y TvEpNEO aumentó la adherencia de los parásitos salvajes (cepa G3) a las células de próstata (Figura 1.13b), el efecto en el aumento de la adherencia fue mayor cuando las células fueron preincubadas con VEs aisladas de los parásitos TvVPS32 en comparación con TvEpNEO (Figura 1.13b). Estos resultados podrían sugerir que las proteínas presentes y/o la capacidad de unión de las VEs aisladas de los parásitos TvVPS32 y los parásitos TvEpNEO son diferentes. En conclusión, dichos resultados proporcionan evidencia adicional de la importancia de las VEs y la proteína VPS32 en la regulación de la adherencia del parásito a las células hospedadoras en *T. vaginalis*.



**Figura 1.13. La preincubación de las células del hospedador con VEs aisladas de parásitos TvVPS32 aumentan la adherencia de una cepa poco adherente en comparación con la pre-incubación con VEs aisladas de TvEpNEO.** (a) Ensayo de adherencia con una cepa poco adherente (G3) en donde la monocapa de células hospedadoras fueron preincubadas durante 1 h con concentraciones crecientes de VEs aisladas (5, 10 y 20 µg) de los parásitos TvEpNEO y TvVPS32. Como control, se realizó una incubación de las células con PBS. Los parásitos adheridos se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia. (b) Cuantificación de los parásitos G3 adheridos a la monocapa de células. La adherencia se expresó en veces relativizando al control. Se utilizó t-test para determinar diferencias significativas (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

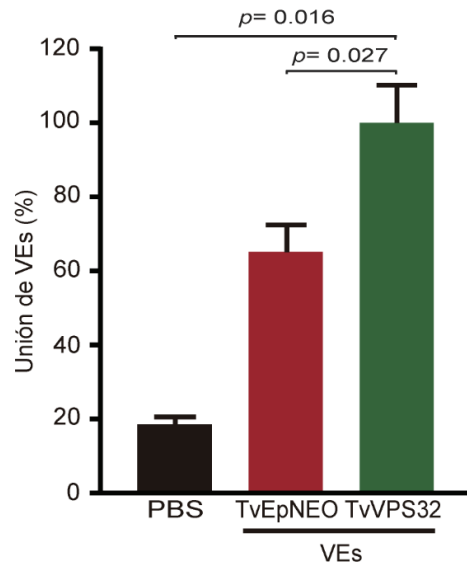
### 1.5.5. Las VEs de los parásitos TvVPS32 tienen una mayor capacidad de unión a las células hospedadoras que las VEs de los parásitos TvEpNEO

Teniendo en cuenta los resultados previos, decidimos evaluar la capacidad de unión de las VEs de TvVPS32 a las células hospedadoras comparadas con las VEs de TvEpNEO. Para abordar este ensayo, se aislaron VEs de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO y se marcaron con el fluoróforo PKH67 (utilizado comúnmente para el marcaje de membranas de VEs). Para esto, 10 µg de VEs marcadas con PKH67 se incubaron con una monocapa de células NHPe1 durante 3 horas, y luego de realizar lavados sucesivos para eliminar el fluoróforo no incorporado, se cuantificó la capacidad de unión a las células del hospedador mediante cuantificación de la intensidad de señal mediante microscopía de fluorescencia (Figuras 1.14 y 1.15). Como control de inespecificidad, se realizó en paralelo el marcaje con PKH67 de un tubo con PBS (sin VEs).



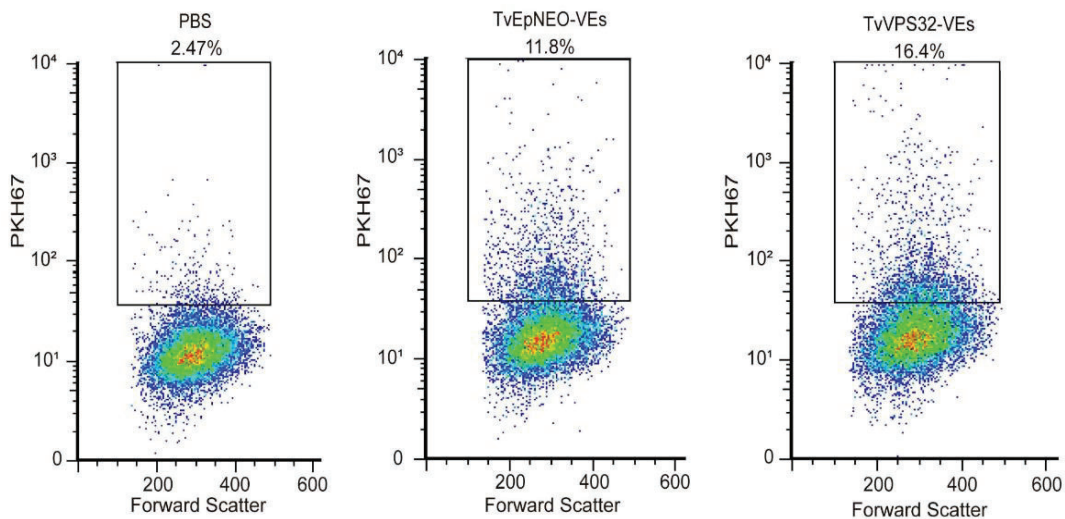
**Figura 1.14. Las TvVPS32-VEs tienen mayor afinidad por las células hospedadoras que las TvEpNEO-VEs.** Las VEs liberadas por los parásitos TvVPS32 y TvEpNEO fueron marcadas con el fluoróforo de membrana PKH67 (verde) e incubadas con una monocapa de células prostáticas durante 3 horas. Como control, las células de próstata fueron incubadas con PBS conteniendo PHK67. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestra una imagen representativa de 20 que se tomaron en las mismas condiciones para ser analizadas.

Los resultados obtenidos indican que las células que fueron incubadas con las VEs aisladas de parásitos TvVPS32 presentaron aproximadamente un 40% más de fluorescencia en comparación con las células que fueron incubadas con las VEs aisladas de parásitos TvEpNEO (Figura 1.15).



**Figura 1.15. Cuantificación de la fluorescencia emitida por las células hospedadoras incubadas con VEs marcadas con PKH67.** Se fijó arbitrariamente como 100% la fluorescencia emitida por las células hospedadoras incubadas con las TvVPS32-VEs. Se realizaron 3 experimentos independientes. Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Alternativamente, para evaluar la capacidad de unión de las VEs aisladas a las células hospedadoras,  $1 \times 10^6$  células prostáticas en suspensión fueron incubadas durante 1 hora a  $37^\circ \text{C}$  con  $10 \mu\text{g}$  de VEs marcadas con PKH67 de ambos parásitos transfectados y posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo (Figuras 1.16 y 1.17).

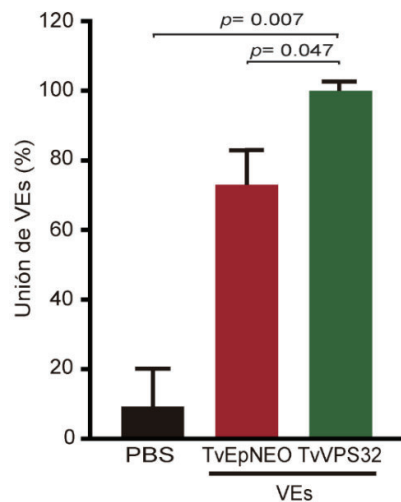


**Figura 1.16. Las TvVPS32-VEs tienen mayor afinidad por las células hospedadoras que las TvEpNEO-VEs.** VEs aisladas de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO marcadas con el fluoróforo de membrana PKH67 (verde) fueron incubadas con  $1 \times 10^6$  células prostáticas en



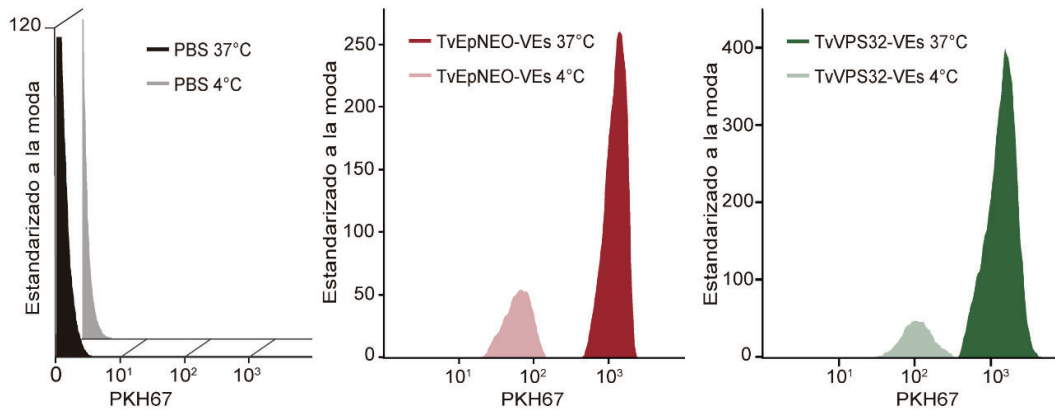
suspensión por 1 h y analizadas por citometría de flujo. Como control, las células de próstata se incubaron con PBS con PKH67.

En este caso, el aumento fue de aproximadamente 30% más de fluorescencia en las células que fueron incubadas con las VEs aisladas de parásitos TvVPS32 (Figura 1.17). Estos resultados sugieren que las VEs aisladas de parásitos TvVPS32 poseen mayor capacidad de unión que aquellas aisladas de TvEpNEO.



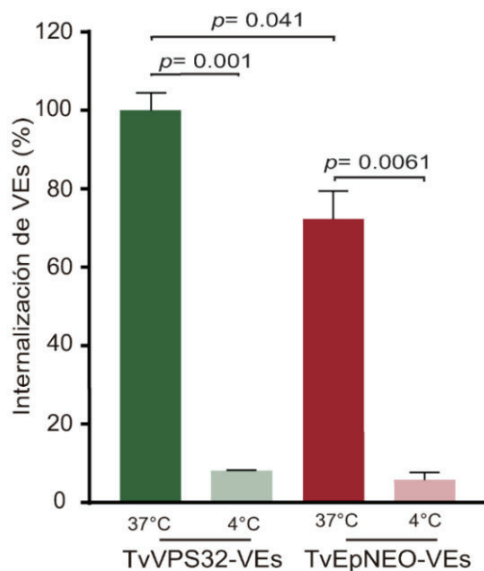
**Figura 1.17. Cuantificación de la fluorescencia analizada por citometría de flujo por las células hospedadoras luego de la incubación con VEs marcadas de TvVPS32 y TvEpNEO.** Arbitrariamente se fijó como 100% la fluorescencia emitida por las células hospedadoras incubadas con las TvVPS32-VEs. Se realizaron 3 experimentos independientes. Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Posteriormente, decidimos evaluar si las diferencias observadas entre las VEs de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO se debían a diferencias en la capacidad de unión y/o internalización por las células hospedadoras. Para ello, 10  $\mu\text{g}$  de VEs marcadas con PKH67 fueron incubadas con  $1 \times 10^6$  células prostáticas en suspensión durante 1 hora a 37 °C o a 4 °C y analizadas por citometría de flujo. Como control de inespecificidad, se realizó en paralelo la incubación de las células prostáticas con PBS marcado con PKH67 (Figuras 1.18 y 1.19). La incubación de las VEs a ambas temperaturas nos permite evaluar tanto la unión como la internalización de VEs ya que a 4 °C disminuye la fluidez de la membrana celular, afectando la incorporación de moléculas. En el caso de que las VEs se unan a las células prostáticas, pero no se internalicen, esperaríamos encontrar semejanza en la fluorescencia en ambas temperaturas. Alternativamente, si las VEs se están internalizando cuando incubamos a 37 °C la señal debería ser mayor que a 4 °C.



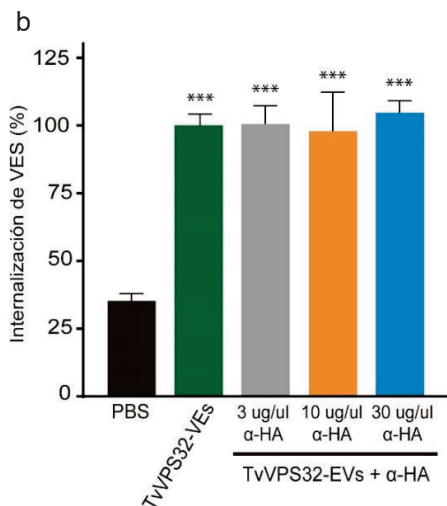
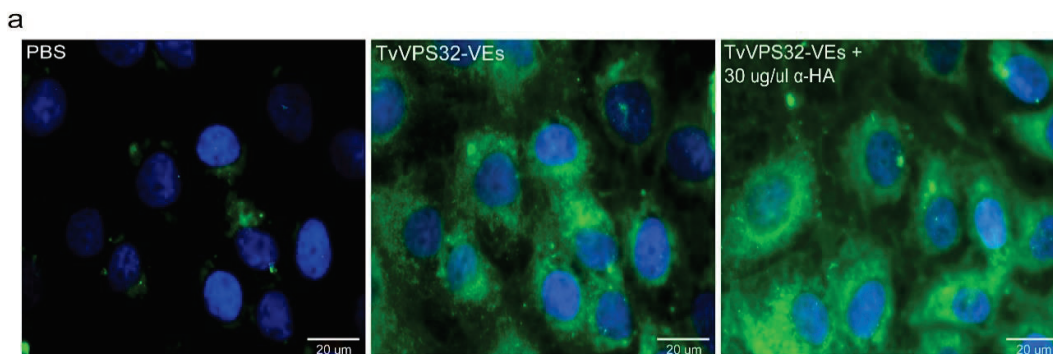
**Figura 1.18. Las VEs de los parásitos TvEpNEO y TvVPS32 son endocitadas.** Células de próstata NHPrE1 en suspensión ( $1 \times 10^6$  células) fueron incubadas con  $10 \mu\text{g}$  de VEs de parásitos TvVPS32 y TvEpNEO marcadas con PKH67. Las incubaciones fueron realizadas tanto a  $37^\circ\text{C}$  como a  $4^\circ\text{C}$ , con el objetivo de observar si las VEs son internalizadas. La incubación se realizó durante 1 hora y la internalización se cuantificó mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos indican que la fluorescencia de las células de próstata fue aproximadamente un 30% mayor cuando la incubación se realizó a  $37^\circ\text{C}$  con las VEs de TvVPS32 comparadas con VEs de parásitos TvEpNEO. Por otra parte, cuando la incubación se realizó a  $4^\circ\text{C}$ , la fluorescencia observada cuando se incubó con VEs de TvEpNEO y TvVPS32 fue 10% mayor que el control y similar con ambas VEs (Figura 1.19).



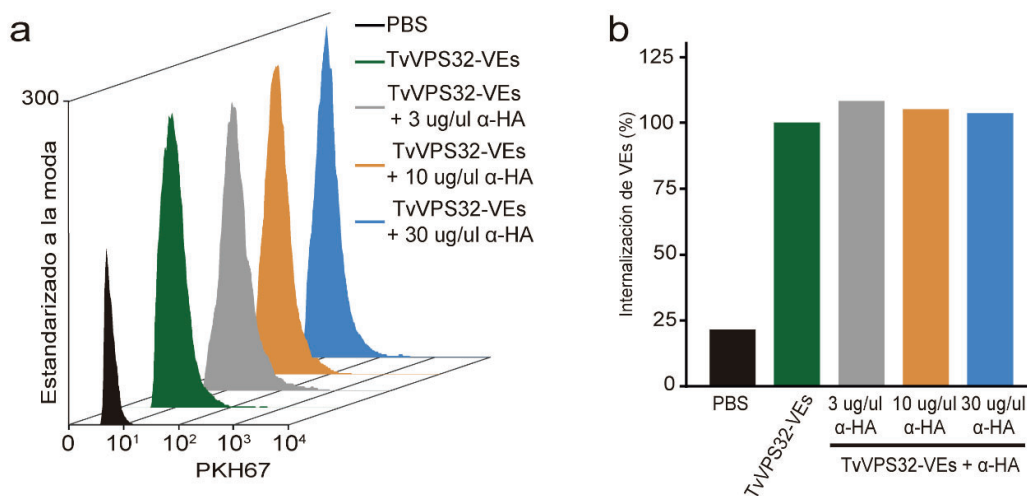
**Figura 1.19. La internalización de VEs es mayor en las TvVPS32-VEs.** La fluorescencia emitida por las células incubadas con las TvVPS32-VEs se tomó como 100% y los valores de las otras incubaciones se relativizaron a esos valores. Las mediciones se realizaron de 3 experimentos independientes. Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Estos resultados sugieren que las VEs no solo se están uniendo a la membrana celular de las células hospedadoras, sino que también están siendo internalizadas. Posteriormente, para evaluar si la proteína VPS32 tenía un rol en la unión de las VEs a las células de próstata realizamos un experimento de bloqueo de la unión mediante el uso de un anticuerpo específico. Para esto, 10  $\mu\text{g}$  de VEs aisladas de parásitos TvVPS32 marcadas con PKH67 fueron preincubadas con concentraciones crecientes de un anticuerpo anti-HA (3, 10 y 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Posteriormente, luego de lavar las VEs para eliminar el anticuerpo no unido, las VEs se incubaron con una monocapa de células NHPRE1 durante 1 hora. Posteriormente, la capacidad de unión de las VEs a las células prostáticas fue analizada mediante microscopía de fluorescencia (Figuras 1.20a y 1.20b). Como se puede observar en la Figura 1.20, la fluorescencia no se vio afectada por la pre-incubación con el anticuerpo anti-HA, lo que sugiere que la proteína VPS32 no sería el ligando responsable de la unión de las VEs a las células de próstata.



**Figura 1.20. La proteína TvVPS32 no regularía la unión de las VEs a las células prostáticas.** (a) VEs de TvVPS32 marcadas con PKH67 (10  $\mu\text{g}$ ) - se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpo anti-HA (3, 10 y 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) durante 1 h. Luego, se incubaron con una monocapa de células de próstata durante 3 horas y se analizó la internalización de las VEs mediante microscopía de fluorescencia. Como control, la monocapa de células se incubó con PBS. Se muestra una imagen representativa de 20 que se tomaron para realizar el análisis. (b) Se cuantificó la fluorescencia emitida por las células hospedadoras y se fijó arbitrariamente como 100% la fluorescencia emitida por las células incubadas solamente con TvVPS32-VEs. Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos (\*\* $p < 0.001$ ).

Para confirmar estos resultados, evaluamos la capacidad de internalizar las VEs de las células prostáticas después de preincubar dichas VEs con el anticuerpo anti-HA, mediante citometría de flujo. Para esto, 10  $\mu\text{g}$  de VEs marcadas con PKH67 fueron pre-incubadas con distintas concentraciones de anticuerpo anti-HA (3, 10 y 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y posteriormente incubadas con  $1 \times 10^6$  células prostáticas en suspensión durante 1 hora a 37 °C. La unión de las VEs a las células de próstata fue analizada como intensidad de fluorescencia emitida mediante citometría de flujo (Figuras 1.21a y 1.21b). En concordancia con los resultados previos, la intensidad de fluorescencia no se vio afectada por la pre-incubación con el anticuerpo anti-HA. Estos resultados indicarían que la proteína VPS32 no desempeña un rol crítico en la internalización de las VEs.



**Figura 1.21. La proteína VPS32 no desempeña un rol crítico en la internalización de las VEs.** (a) Células de próstata en suspensión ( $1 \times 10^6$  células) fueron incubadas con 10  $\mu\text{g}$  de TvVPS32-VEs previamente bloqueadas con concentraciones crecientes de anticuerpo anti-HA (3, 10 y 30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), fueron marcadas con PKH67 durante 1 h. La internalización de las VEs se analizó mediante citometría de flujo. Como control, se incubaron las células con PBS. (b) Se cuantificó la fluorescencia emitida por las células y se tomó arbitrariamente como 100% la fluorescencia emitida por las células incubadas solamente con TvVPS32-VEs.

### 1.5.6. La proteína VPS32 regula la carga de las VEs liberadas

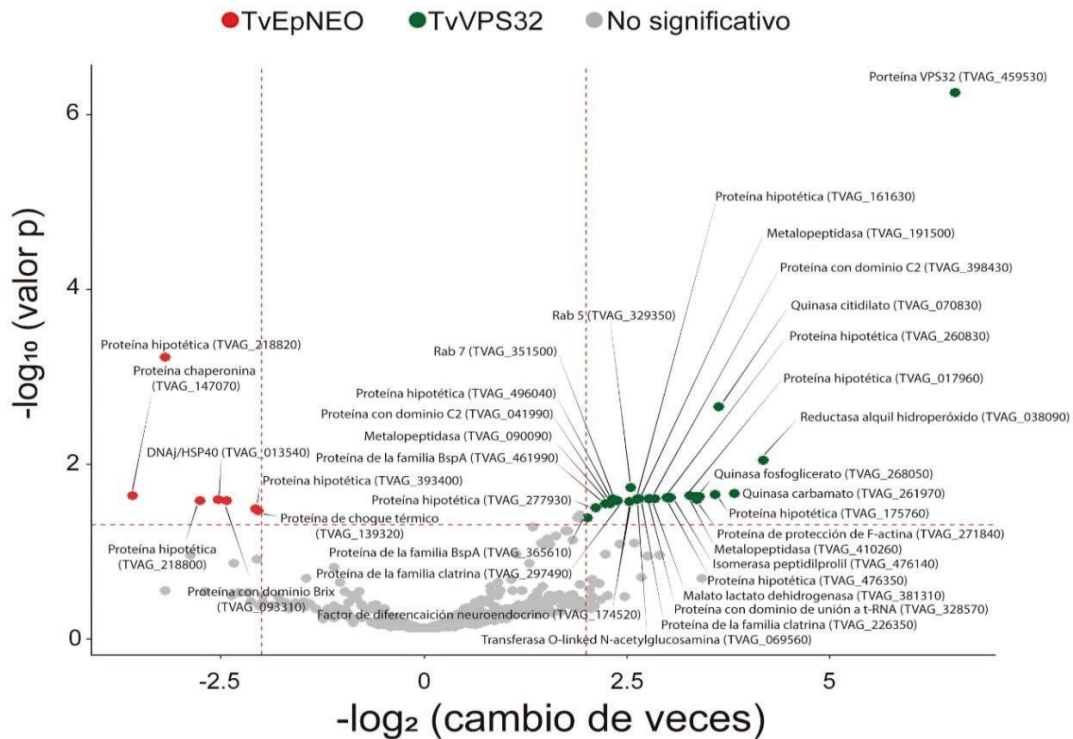
Los resultados presentados en la sección anterior muestran que las TvVPS32-VEs poseen una mayor capacidad de unión a las células hospedadoras que las EpNEO-VEs. Estos resultados sugieren que la proteína VPS32 podría estar relacionada a posibles variaciones del contenido proteico de las VEs. Para evaluar esta hipótesis, realizamos un análisis proteómico cuantitativo con el

objetivo de determinar la identidad y la abundancia de las proteínas presentes en las VEs liberadas por los parásitos TvVPS32 y TvEpNEO, utilizando cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se analizaron tres aislamientos independientes de VEs a partir de los parásitos TvVPS32 y TvEpNEO, y la abundancia de proteínas en las muestras fue comparada utilizando los valores de intensidad relativa (LFQ), mediante el servidor en línea LFQ-Analyst (Shah et al., 2020). Como criterio de inclusión, y después de excluir los contaminantes, todas aquellas proteínas presentes en al menos dos de las tres muestras analizadas fueron incluidas en el proteoma. Se identificaron un total de 483 proteínas de *T. vaginalis* en las VEs aisladas de TvEpNEO y TvVPS32 (Tabla suplementaria 1: “Proteoma de VEs de *Trichomonas vaginalis*”). Validando el aislamiento de VEs realizado, 314 de las 483 proteínas identificadas en nuestro estudio estaban presentes en los proteomas de exosomas, MVs y proteínas de superficie de *T. vaginalis* publicados previamente (Tabla suplementaria 1) (de Miguel et al., 2010; Nievas et al., 2018; Twu et al., 2013). Posteriormente, se analizaron las proteínas diferenciales entre los aislamientos de TvVPS32-VEs y TvEpNEO-VEs, se transformaron los datos de LFQ utilizando Log2, se agruparon por condiciones y se imputaron los valores faltantes utilizando el modelo mínimo determinista (MinDet) (Lazar et al., 2016). Todas aquellas proteínas que presentaron un cambio de LFQ  $\geq 2$  y un p valor  $\leq 0.05$  en alguno de las dos poblaciones de VEs analizadas se consideraron como proteínas diferenciales. Con estos criterios, se identificaron 36 proteínas que eran más abundantes en las TvVPS32-VEs y 7 proteínas en las TvEpNEO-VEs (Tabla 1.1 y Figura 1.22). Estos resultados nos sugieren que la proteína VPS32 podría estar afectando la composición proteica de las VEs y que dicha composición diferencial podría estar afectando la capacidad de los parásitos de unirse a las células hospedadoras.

Locus	Proteínas	Cambio expresado en veces
<b>Proteínas encontradas diferencialmente en las TvVPS32-VEs</b>		
TVAG_459530	Proteína VPS32	42.90
TVAG_038090	Reductasa alquil hidroperóxido	17.56
TVAG_261970; TVAG_420500; TVAG_420510	Quinasa carbamato	14.67
TVAG_070830	Quinasa citidilato	13.18
TVAG_175760	Proteína hipotética	12.89
TVAG_268050	Quinasa fosfoglicerato	11.49
TVAG_017960	Proteína hipotética	11.29
TVAG_271840	Proteína de protección de F-actina	11.22
TVAG_410260	Metalopeptidasa	10.69
TVAG_476140	Isomerasa peptidilprolil	9.24
TVAG_260830	Proteína hipotética	9.12
TVAG_476350	Proteína hipotética	8.94
TVAG_381310	Malato lactato dehidrogenasa	8.12
TVAG_328570	Proteína con dominio de unión a t-RNA	7.78
TVAG_161630	Proteína hipotética	7.67
TVAG_398430	Proteína con dominio C2	7.67
TVAG_226350	Proteína de la familia clatrina	7.02
TVAG_069560	Transferasa O-linked N-acetylglucosamina	6.97
TVAG_191500	Metalopeptidasa	6.86
TVAG_329350; TVAG_355600; TVAG_456910	Rab5	6.50
TVAG_174520	Factor de diferenciación neuroendocrino	6.45
TVAG_496040	Proteína hipotética	5.71
TVAG_351500	Rab7	5.43
TVAG_297490	Proteína de la familia clatrina	5.29
TVAG_461990; TVAG_162010; TVAG_607280; TVAG_530020	Proteína de la familia BspA	5.29
TVAG_041990	Proteína con dominio C2	5.20
TVAG_090090	Metalopeptidasa	4.97
TVAG_277930	Proteína hipotética	4.49
TVAG_365610	Proteína de la familia BspA	4.08
<b>Proteínas encontradas diferencialmente en las TvEpNEO-VEs</b>		
TVAG_147070	Proteína chaperonina	12.89
TVAG_218820	Proteína hipotética	10.18
TVAG_218800	Proteína hipotética	7.62
TVAG_013540	DNAj/HSP40	6.40
TVAG_093310	Proteína con dominio Brix	5.90
TVAG_393400	Proteína hipotética	4.28
TVAG_139320; TVAG_151620	Proteína de choque térmico	4.16

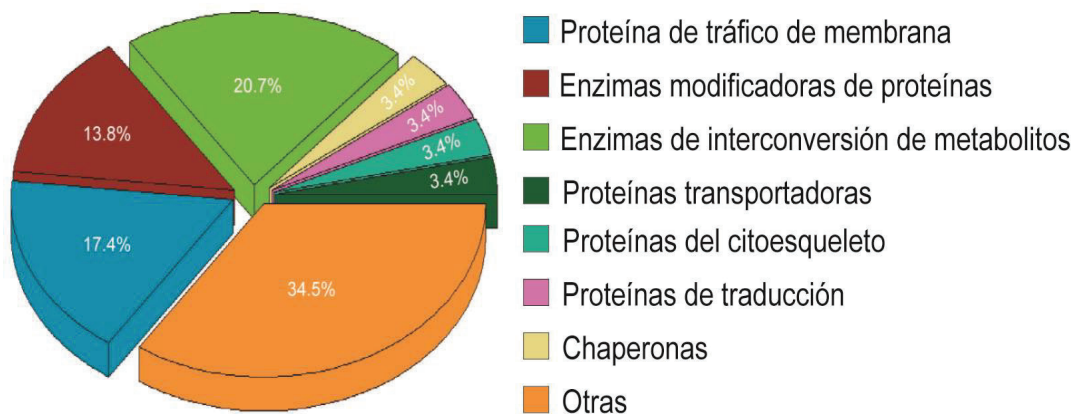
**Tabla 1.1.** Proteínas diferenciales presentes en las muestras de VEs encontradas en el análisis proteómico.

En concordancia con la sobreexpresión esperada debido a la transfección del constructo, es interesante destacar que la abundancia de la proteína VPS32 es 43 veces mayor en las VEs aisladas de parásitos TvVPS32 en comparación con las VEs aisladas de TvEpNEO. Este hallazgo respalda las conclusiones previas que sugieren que las TvVPS32-VEs pueden ser cargadas de manera selectiva con grupos específicos de proteínas. Resulta interesante destacar que en las VEs aisladas de los parásitos TvVPS32 observamos una mayor abundancia de algunas proteínas asociadas al tráfico intracelular, incluyendo dos proteínas Rab (Rab5:  $\approx 6$  veces y Rab 7:  $\approx 5$  veces), y dos proteínas relacionadas con clatrina (cadena ligera de clatrina:  $\approx 5$  veces y adaptador AP-1 de clatrina:  $\approx 7$  veces) (ver Tabla 1.1 y Figura 1.22). Además, encontramos varias proteínas diferenciales de interés en las muestras de TvVPS32-VEs, incluyendo tres proteínas con actividad quinasa ( $\approx 14$ ,  $\approx 13$  y  $\approx 11$  veces) y enzimas metabólicas ( $\approx 8$  y  $\approx 7$  veces) (Figura 1.22 y Tabla 1.1). Hallamos también siete proteínas hipotéticas ( $\approx 13$ ,  $\approx 11$ ,  $\approx 9$ ,  $\approx 9$ ,  $\approx 7$  y  $\approx 6$  veces) que fueron significativamente más abundantes en las muestras de TvVPS32-VEs, lo cual representa un aspecto de gran interés que podría ser objeto de estudios más detallados en el futuro (Tabla 1.1). Por último, y en concordancia con los resultados previos que demuestran que los parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32 son más adherentes, varias proteínas asociadas al proceso de patogénesis del parásito son más abundantes en las VEs de parásitos TvVPS32. Específicamente, hemos identificado dos miembros de la familia de proteínas BspA con repeticiones ricas en leucina ( $\approx 5$  y  $\approx 4$  veces) y tres peptidasas (peptidasa de cisteína tipo catepsina L:  $\approx 11$  veces; proteína similar a la leishmanolisina:  $\approx 7$  veces y metalopeptidasa tipo T:  $\approx 5$  veces) (Tabla 1.1). Las proteínas BspA se han descrito como factores importantes para la adherencia de los parásitos a las células hospedadoras (Handrich et al., 2019), como así también las proteasas (Hirt et al., 2007).



**Figura 1.22. Proteínas diferenciales identificadas en los proteomas de las TvVPS32-VEs comparados con las TvEpNEO-VEs.** Gráfico tipo volcano representando las 483 proteínas identificadas en el proteoma cuantitativo de las VEs liberadas por los parásitos TvVPS32 y TvEpNEO. Los círculos verdes, representan las proteínas que se encontraron diferencialmente en las TvVPS32-VEs (29 proteínas) y los círculos rojos, las que se encontraron diferencialmente en las TvEpNEO-VEs (8 proteínas).

Además, las proteínas diferenciales encontradas en las TvVPS32-VEs se clasificaron según su función y pudimos observar que pertenecen a grupos muy variados (Figura 1.23).



**Figura 1.23. Las proteínas presentes diferencialmente en las TvVPS32-VEs pertenecen a grupos funcionales variados.** Utilizando el genoma de referencia, las proteínas



detectadas diferencialmente en las TvVPS32-VEs las clasificamos en grupos según su función predicha.

En resumen, estos resultados indican que las VEs de los parásitos TvVPS32 pueden contener un conjunto diverso de proteínas únicas o sobrerrepresentadas que podrían estar contribuyendo, al menos en parte, al efecto observado en la adherencia del parásito.

## Discusión

El rol de las proteínas ESCRT en la biogénesis de VEs ha sido ampliamente estudiado en mamíferos (Colombo et al., 2013). En estas células, este complejo regula la escisión de membranas modulando de esta manera la formación de vesículas ya sea hacia compartimentos internos o hacia el exterior de las células. Específicamente, se ha propuesto que el complejo ESCRT III remodela y escinde las membranas mediante la formación de filamentos, espirales planos, tubos y embudos cónicos (Alonso Y Adell et al., 2016). Dado que la escisión de membranas es clave para la generación de vesículas intraluminales en los endosomas y la liberación de MVs desde la membrana plasmática (Schöneberg et al., 2017), el complejo ESCRT III ha sido propuesto como un regulador clave de este proceso. Aunque se cree que la vía ESCRT es el principal impulsor de la biogénesis de VEs en células de mamíferos, la función de estas proteínas en patógenos eucariotas unicelulares aún no fue analizada en detalle (Camacho et al., 2023). En este trabajo de tesis, hemos analizado el rol de un miembro del complejo ESCRTIII, la proteína VPS32, en la biogénesis de vesículas extracelulares en el parásito *T. vaginalis*. Los resultados obtenidos no solo demostraron que VPS32 tiene un papel en la biogénesis de VEs, sino que esta proteína también desempeña un rol central en la regulación de la unión del parásito a las células hospedadoras prostáticas. Es importante destacar que nunca se había propuesto la identificación de proteínas del ESCRT como actores clave en la regulación de la patogénesis en un eucariota unicelular. Previo a este trabajo de tesis, se había descrito que la AAA+-ATPasa Vps4a asociada a ESCRT regulaba la liberación de vesículas similares a exosomas (EIV) en el parásito protozoario *Giardia lamblia* (Moyano et al., 2019). De manera similar, la supresión génica de la proteína Vps36 compromete la secreción de exosomas en el parásito *Trypanosoma brucei* (Eliaz et al., 2017). Sin embargo, ninguno de estos trabajos analizó el rol del complejo ESCRT en el contexto de patogénesis. Si bien la unión de *T. vaginalis* a las células hospedadoras probablemente depende de múltiples factores (Bastida-Corcuera et al., 2005; Chen et al., 2019; de Miguel et al., 2010; Rendon-Gandarilla et al., 2013; Riestra et al., 2015), el aumento en la adherencia del parásito a las células del hospedador causado por la sobreexpresión de la proteína VPS32, es el efecto fenotípico más destacado

mediado por la sobreexpresión exógena de una única proteína en *T. vaginalis*. Previo al desarrollo de esta tesis, el efecto más fuerte en la unión a las células hospedadoras se había observado con la sobreexpresión de la Proteína tipo Cadherina (CLP), la cual se determinó que ocasionaba un aumento en la adherencia del parásito de 3,5 veces respecto al control (parásitos transfectados con el plásmido vacío) (Chen et al., 2019, p. 201); en comparación, nuestro trabajo determinó un aumento de 33 veces con la sobreexpresión de TvVPS32. Basándonos en estos antecedentes y considerando el efecto drástico en la adherencia observado con la sobreexpresión de TvVPS32, sería interesante evaluar si esta proteína mediaría su función a través de la asociación con otras proteínas u otras moléculas. Trabajos anteriores demostraron que las VEs liberadas por *T. vaginalis* poseen un rol importante en la modulación de la adherencia del parásito. Específicamente, ensayos realizados preincubando las células hospedadoras con VEs aisladas de cepas altamente adherentes de *T. vaginalis*; indujeron un fuerte efecto en la unión a las células hospedadoras de parásitos de cepas menos adherentes (Nievas et al., 2018; Twu et al., 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes, el fenotipo observado en los parásitos transfectados con TvVPS32 en cuanto a la adherencia del parásito podría explicarse, al menos parcialmente, debido a un aumento en la liberación de VEs. En este sentido, y en concordancia con lo descrito anteriormente (Twu et al., 2013), nuestros resultados también demuestran que las VEs tienen un papel en la modulación de la adherencia ya que la pre-incubación de células hospedadoras con VEs aisladas de parásitos TvVPS32 o TvEpNEO aumentó la unión a las células hospedadoras de una cepa poco adherente. Es interesante destacar que se observa un efecto más fuerte en el aumento de la adherencia del parásito cuando las células se pre-incuban con VEs aisladas de TvVPS32. Esta observación podría sugerir que el contenido proteico de las VEs aisladas de TvEpNEO o TvVPS32 es diferente.

En un intento por comprender estas diferencias hemos realizado un análisis proteómico para identificar las proteínas diferenciales en las VEs de TvEpNEO y TvVPS32. Mediante este análisis hemos identificado 29 proteínas diferenciales, las cuales son más abundantes (>2 veces) en las VEs de TvVPS32 que en las VEs de TvEpNEO (Tabla 1.1). Estos análisis proteómicos cuantitativos indicaron

que las VEs de los parásitos TvVPS32 se encontraban enriquecidas con proteínas específicas. Particularmente, encontramos que en las VEs liberadas por los parásitos TvVPS32 hay mayor cantidad de proteínas con actividad quinasa y clatrina, entre otras. En otros tipos celulares, la clatrina se encuentra involucrada en la selección de la carga dentro de las VEs a través del reconocimiento de señales presentes en los dominios citosólicos de las proteínas de membrana (Bonifacino & Glick, 2004). Además, el ensamblaje de clatrina está regulado por quinasas, fosfatasa y otras proteínas accesorias (Lafer, 2002). Recientemente, se ha demostrado que el reclutamiento de clatrina a los endosomas es necesario para el posterior reclutamiento del complejo ESCRT dentro de los CMVs (Wenzel et al., 2018). El hecho de que hayamos podido detectar estas proteínas en niveles elevados en las VEs de los parásitos TvVPS32, podría indicar que la proteína VPS32 estimula su producción o su selección dentro de las VEs. Nuestros resultados también identificaron mayores cantidades de Rab5 y Rab7 en las VEs de los parásitos TvVPS32, lo que podría sugerir un rol de estas proteínas en la biogénesis o en la liberación de vesículas extracelulares. En este sentido, las proteínas Rab4, Rab5, Rab11, Rab35, Rab27a y Rab27b han sido previamente asociadas a la liberación de VEs en diferentes tipos de células (Abels & Breakefield, 2016; Ostrowski et al., 2010). Específicamente, también se ha demostrado que la proteína Rab7 contribuye a la liberación de vesículas desde la punta del cilio primario (Wang et al., 2019). Sin embargo, se necesitan más estudios para establecer la función específica de las proteínas Rab dentro de este proceso en *T. vaginalis*.

Además, en el proteoma de VEs aisladas de los parásitos TvVPS32 se encontraron proteínas previamente asociadas con la patogénesis de *T. vaginalis*. Específicamente, dos miembros de la familia de proteínas BspA (las cuales se ha descrito que presentan una localización en la superficie celular) fueron detectadas más abundantemente en las VEs aisladas de parásitos TvVPS32. En bacterias las proteínas BspA tienen un rol relevante en la colonización de la mucosa oral y en la activación de la respuesta inmune del hospedador (Noël et al., 2010). Es importante destacar que en estos organismos se ha demostrado un efecto sinérgico de las proteínas BspA y las vesículas de la membrana externa (OMVs) en relación a la adherencia y colonización de células epiteliales

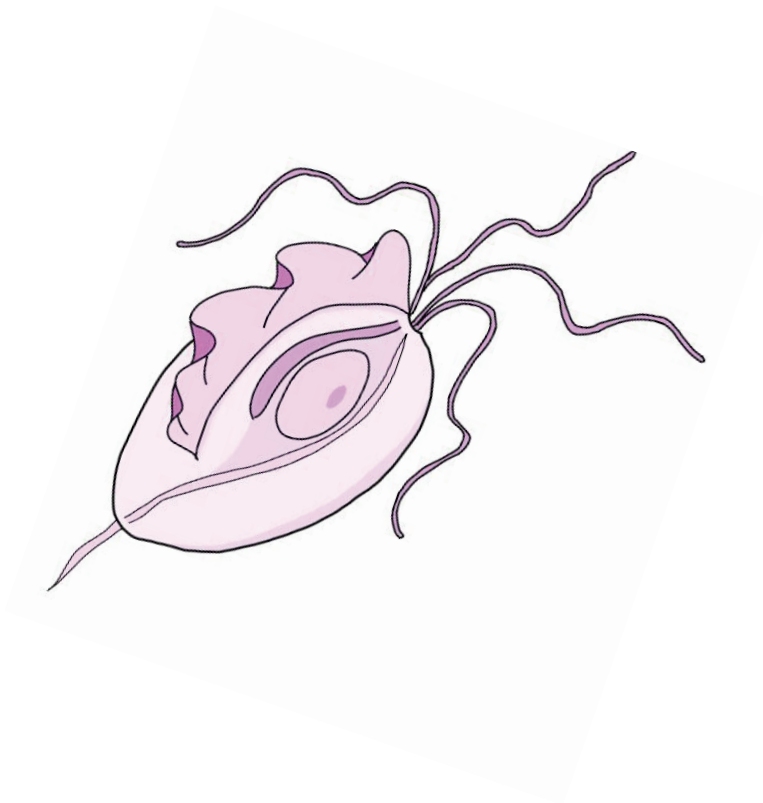
(Inagaki Satoru et al., 2006). En *Entamoeba histolytica*, una reducción en los niveles de una proteína de la familia BspA disminuye la invasión del parásito en la mucosa del colon y otra proteína similar a BspA (EHI\_016490) funciona como receptor quimiotáctico para el factor de necrosis tumoral (Silvestre et al., 2015). Es importante destacar que algunos autores sugieren que las proteínas BspA de *T. vaginalis* podrían tener una función similar a la de las bacterias, ya que la sobreexpresión de una proteína BspA (TVAG\_240680) aumentó la adherencia a las células epiteliales de las vías urinarias en una cepa de *T. vaginalis* poco adherente (Handrich et al., 2019). Aunque se requieren más estudios para comprender el rol de esta familia de proteínas dentro de las VEs, la presencia de dos proteínas BspA en el proteoma de VEs de parásitos TvVPS32 podría estar asociada a la regulación de la unión de VEs a las células hospedadoras. Otra proteína que se detectó diferencialmente en las VEs liberadas por los parásitos TvVPS32, fue la proteína malato deshidrogenasa. Curiosamente, la proteína malato deshidrogenasa fue descrita en grandes cantidades en los trofozoítos ameboides de *T. vaginalis* unidos a la fibronectina (Huang et al., 2012). Además, algunas isoformas de malato deshidrogenasa se encontraron expresadas diferencialmente en un aislado clínico fresco altamente virulento de *T. vaginalis* (Cuervo et al., 2008). Estos resultados podrían indicar un papel de esta proteína en la adherencia del parásito a las células hospedadoras. Además, en las VEs aisladas de parásitos TvVPS32 se identificaron diferencialmente también varias peptidasas, incluyendo una catepsina L cisteína peptidasa, una proteína GP63 de la familia M8 del Clan MA, y una metalopeptidasa M20. *T. vaginalis* libera varios tipos de proteasas, como serina proteasas, cisteína proteasas y metaloproteinasas, que tienen un rol importante en la regulación de la citólisis y la adherencia del parásito (Alderete et al., 1991; Arroyo & Alderete, 1989; Ma et al., 2011). Considerando que las peptidasas extracelulares de *T. vaginalis* se han relacionado previamente con la degradación de la capa de mucina que cubre las células epiteliales (Lehker & Sweeney, 1999) y las mismas han sido detectadas en lavados vaginales de mujeres infectadas, es posible que estas proteínas degraden proteínas del hospedador o de la matriz extracelular en el sitio infección (Ryan et al., 2011). En *Leishmania*, las proteasas GP63, presentes en el proteoma de exosomas, han sido reportadas como un factor de virulencia importante que contribuye a la supervivencia del parásito durante el momento

inicial de la infección (Olivier et al., 2012). En *T. vaginalis*, se han identificado 48 miembros de la familia de proteasas GP63 (Quan et al., 2014). Aunque la relevancia de estas metaloproteinasas no ha sido completamente dilucidado, se ha propuesto que desempeñan un papel vital en el proceso de infección (Ma et al., 2011). Por último, 7 de las 29 proteínas encontradas diferencialmente son proteínas hipotéticas únicas de *T. vaginalis*. La identificación de estas proteínas en VEs proporciona una base para futuros estudios orientados a analizar posibles nuevos factores que regulen la interacción parásito-célula hospedadora. En este sentido, un trabajo previo ha identificado proteínas hipotéticas de superficie con expresión diferencial en cepas adherentes que modulan la adherencia *T. vaginalis* (de Miguel et al., 2010; Pachano et al., 2017). Nuestros resultados indican que el contenido de las VEs parece ser altamente selectivo y el complejo ESCRT-III podría ser un regulador clave en el proceso de selección de la carga proteica. Trabajos futuros se focalizarán en identificar los actores moleculares que regulan la carga proteica en las VEs de las distintas cepas que podrían estar afectando la adherencia del parásito a las células hospedadoras.

Estas observaciones sin duda contribuirán a mejorar la comprensión acerca de los mecanismos moleculares que regulan la biogénesis y el contenido de las vesículas. En el futuro, las mejoras continuas en los enfoques de edición de genomas mediados por CRISPR nos permitirán modular la naturaleza de las vesículas extracelulares y su composición para obtener una mejor comprensión de las acciones dinámicas de la maquinaria ESCRT en la regulación de la biogénesis de las vesículas extracelulares y la patogénesis parasitaria.

# CAPÍTULO II

**Rol de los filopodios, citonemas y vesículas extracelulares en la interacción parásito-parásito en *Trichomonas vaginalis***



## 2.1. Resumen

Las infecciones producidas por *T. vaginalis* varían desde asintomáticas hasta altamente inflamatorias, dependiendo de factores del hospedador y de características propias de la cepa del parásito. Con una incidencia estimada de 156 millones de casos, es esperable encontrar que muchas de estas infecciones sean causadas por más de una cepa del parásito, es decir, que sean infecciones mixtas. Aunque se considera evidente que los parásitos interactúan con su hospedador para mejorar su supervivencia y transmisión, se ha subestimado en gran medida hasta qué punto los parásitos unicelulares se comunican entre sí. En este segundo capítulo, demostramos que diferentes cepas de *T. vaginalis* son capaces de comunicarse a través de la formación de conexiones celulares del tipo citonemas. Mostramos que las cepas adherentes de *T. vaginalis* forman abundantes protrusiones de membrana y que la formación de citonemas de una cepa adherente (CDC1132) se ve afectada por la presencia de una cepa diferente (G3 o B7RC2). Utilizando ensayos con insertos de cultivo celular, demostramos que el efecto en la formación de citonemas no depende del contacto entre los parásitos y que las vesículas extracelulares son responsables, al menos en parte, de la comunicación entre cepas. En este sentido, encontramos que las VEs aisladas de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 tienen un contenido distinto de proteínas, algunas de las cuales están involucradas en la señalización y comunicación, entre otras funciones. Por último, mostramos que la adherencia del parásito a las células hospedadoras se ve afectada por esta comunicación entre cepas, ya que la unión de la cepa adherente CDC1132 a las células de la próstata es significativamente mayor en presencia de las cepas G3 o B7RC2. También observamos que una cepa poco adherente (G3) se adhiere más a las células de próstata en presencia de una cepa altamente adherente (CDC1132), lo que puede tener repercusiones clínicas significativas. El estudio de la señalización y la comunicación celular en estos parásitos aportará información sobre sus características biológicas básicas, lo cual podría tener implicancias en la patogénesis de este protozoario.



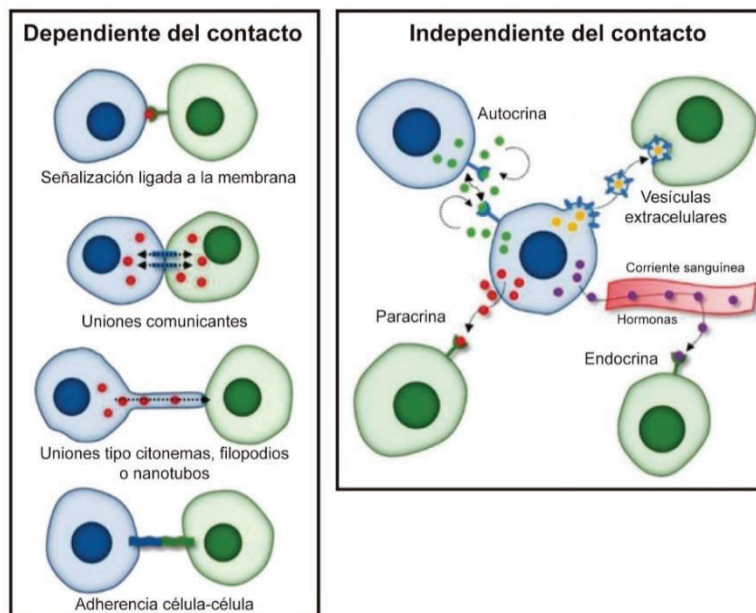
## 2.2. Introducción

### **Comunicación intercelular**

La vida multicelular depende de la coordinación de las actividades celulares, las cuales se basan en las interacciones entre los diversos tipos celulares y tejidos de un organismo (Bonnans et al., 2014; Rouault & Hakim, 2012; Zhou et al., 2018). Teniendo en cuenta esto, los estudios sobre las funciones celulares requieren considerar el contexto celular y no células aisladas (Bich et al., 2019). Las células poseen diversas moléculas que regulan las interacciones tales como iones, metabolitos, integrinas, receptores, proteínas de unión, proteínas estructurales, ligandos y proteínas secretadas de la matriz extracelular, entre otras (Armingol et al., 2021). Algunas de estas moléculas que median la comunicación célula-célula se encuentran localizadas en la membrana (por ejemplo, las moléculas que regulan la adherencia celular); mientras que otras son liberadas (como hormonas, factores de crecimiento, quimioquinas, citocinas y neurotransmisores). Las células receptoras desencadenan una cascada de señalización, lo que generalmente resulta en la modificación de los factores de transcripción y la expresión génica con una consecuente modificación del fenotipo (Armingol et al., 2021).

Las diferentes formas de comunicación pueden ser clasificadas en dos grupos: independiente o dependiente del contacto (B. A. Yang et al., 2021). Dentro de la comunicación independiente del contacto, podemos encontrar distintos tipos de señales como por ejemplo la señalización autocrina, paracrina, endocrina y dependiente de vesículas extracelulares. La señalización autocrina se refiere a la comunicación a través de moléculas secretadas por una célula que influyen en sí mismas (Tan, 2016). La comunicación paracrina depende de la difusión de moléculas de señalización secretadas de una célula a otra y no requiere el contacto directo entre células (Tan, 2016). La comunicación endocrina (típicamente las hormonas) representa una comunicación intercelular en la cual las moléculas señalizadoras se secretan y viajan largas distancias a través de fluidos extracelulares (Armingol et al., 2021; B. A. Yang et al., 2021). Por último, las VEs se describen como un mecanismo de comunicación independiente del contacto dependiente de estructuras delimitadas por bicapas lipídicas que

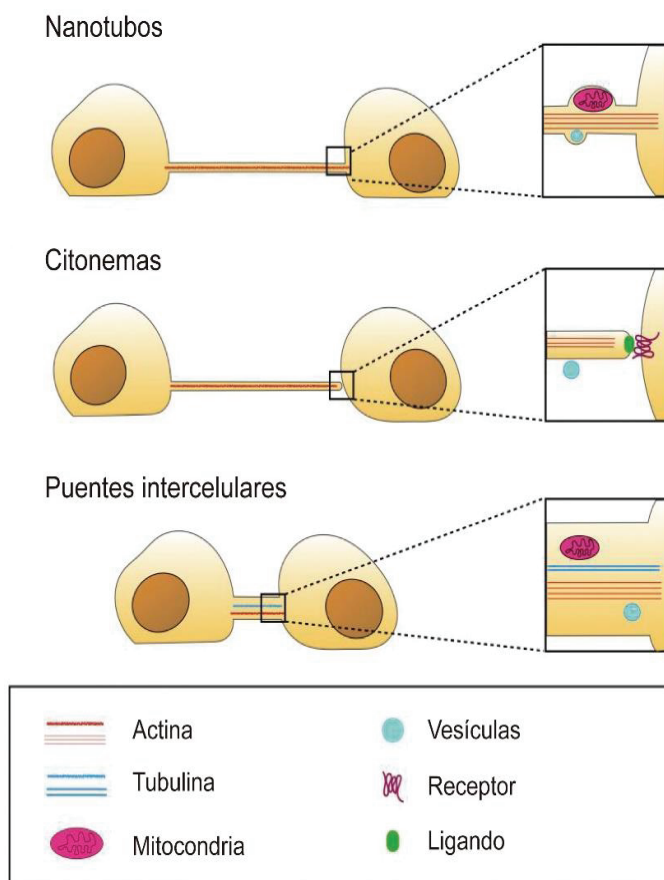
pueden contener proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y que pueden modificar el estado de las células receptoras (B. A. Yang et al., 2021, p. 201) (Figura 2.1). A su vez, la comunicación dependiente del contacto se puede clasificar en: (I) uniones a través de proteínas transmembrana como selectinas, integrinas, cadherinas y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Cavallaro & Dejana, 2011), (II) uniones gap que conectan los citoplasmas de células vecinas (Krutovskikh et al., 2002), (III) delgadas proyecciones de membrana, las cuales pueden ser del tipo nanotubos, puentes intercelulares, filopodios o citonemas que facilitan la comunicación entre células (Korenkova et al., 2020), o (IV) la unión mutua de marcadores de adherencia celular (CAM, por sus siglas en inglés) en células que interactúan (Cavallaro & Dejana, 2011) (Figura 2.1).



**Figura 2.1. Tipos de interacciones intercelulares.** Dependientes del contacto: Las células efectoras (azules) emiten señales que son reconocidas por las células objetivo (verdes), utilizan estructuras proteicas para transportar moléculas señalizadoras directamente entre los citoplasmas (es decir, uniones comunicantes y uniones tipo citonemas, filopodios o nanotubos) o forman adherencias entre células vecinas. Independientes del contacto: Las células secretoras (azules) liberan factores al espacio extracelular que ejercen efectos dependientes de la distancia en células objetivo específicas (verdes). Tomada de B. A. Yang et al., 2021.

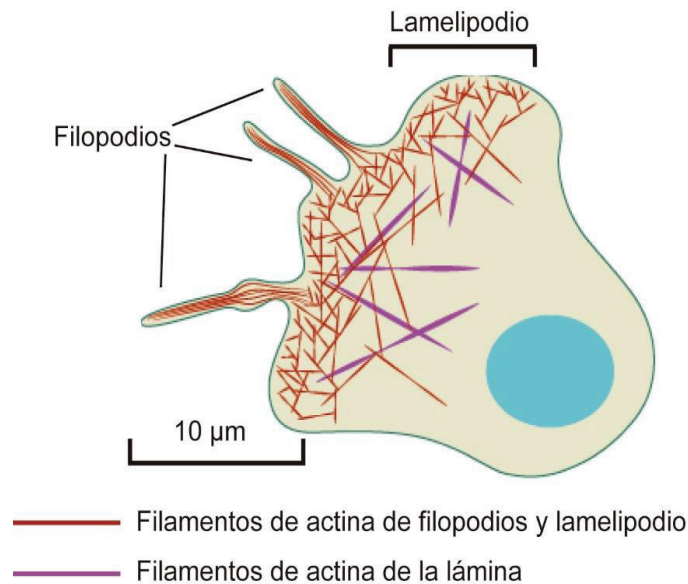
Específicamente, los nanotubos proporcionan una continuidad entre el citosol de células conectadas (Korenkova et al., 2020). Los puentes intercelulares son prolongaciones que se forman por citocinesis incompleta e interconectan células. Los puentes establecen continuidad citoplásmica y son lo suficientemente grandes (diámetro de 0.2 a 10  $\mu\text{m}$ ) como para permitir que las organelas y/o

macromoléculas pasen a través de ellos (Robinson & Cooley, 1996). Los citonemas representan otro tipo de protrusión celular morfológicamente similar a los nanotubos, pero poseen ciertas características particulares. Estas protrusiones contienen actina, pero no microtúbulos, una longitud de hasta 700  $\mu\text{m}$  y un diámetro máximo de 200 nm (Ramírez-Weber & Kornberg, 1999). Tanto los nanotubos como los citonemas son protrusiones celulares largas y delgadas de actina y, por lo tanto, morfológicamente se ven muy similares. La característica más destacada que distingue estos dos tipos de protrusiones celulares es que los citonemas son de extremo cerrado, mientras que los nanotubos son de extremo abierto (Korenkova et al., 2020). Otra diferencia clave radica en su función: mientras que los citonemas permiten la transducción de señales a través de interacciones proteína-proteína (Kornberg & Roy, 2014a), los nanotubos permiten la transferencia de cargas a través del establecimiento de la continuidad del citoplasma (Gerdes & Carvalho, 2008; Rustom et al., 2004) (Figura 2.2). Los citonemas son considerados filopodios especializados (Ramírez-Weber & Kornberg, 1999).



**Figura 2.2.** Similitudes y diferencias entre nanotubos, citonemas y puentes intercelulares. Los nanotubos y citonemas tienen morfologías similares, contienen actina, pero no tubulina. Sin embargo, los nanotubos son de extremo abierto y permiten la continuidad del citoplasma, mientras que los citonemas son de extremo cerrado y permiten interacciones proteína-proteína. Los puentes intercelulares son de extremo abierto, pero generalmente son más cortos y más anchos que los nanotubos. Los puentes intercelulares contienen tubulina. Los tres tipos de estructuras celulares son capaces de transferir carga. Sin embargo, mientras que los citonemas transfieren vesículas en su superficie, los nanotubos y los puentes intercelulares pueden transferir organelas como las mitocondrias en su lumen. Tomada de Korenkova et al., 2020.

Los filopodios son protrusiones de la membrana plasmática, ricas en actina, delgadas y similares a digitaciones que funcionan como tentáculos para que las células exploren su entorno local. Estas estructuras nacen a partir de los lamelipodios, las cuales son prolongaciones de la membrana celular compuestas por microfilamentos de actina los cuales pertenecen al citoesqueleto celular. Los filopodios tienen un diámetro de 0.1 a 0.3  $\mu\text{m}$  y contienen haces paralelos de 10 a 30 filamentos de actina unidos por proteínas de unión a actina (Mellor, 2010) (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** El lamelipodio y los filopodios son estructuras formadas de actina que utilizan las células para explorar el entorno celular. La lámina es necesaria para que la célula se adhiera y posee filamentos de actina diferentes a los lamelipodios y filopodios. Tomada de <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-are-filopodia/how-do-filopodia-pull-on-a-substrate/>.

### **Comunicación intercelular en parásitos**

Todos los organismos vivos perciben señales extracelulares y se comunican con otras células. Los parásitos no son la excepción, estos organismos son sociales, capaces de comunicarse con otras células en alguna etapa de sus vidas para establecer y mantener la infección (Lopez et al., 2011; Oberholzer et al., 2010). Teniendo en cuenta esto, la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento se ha focalizado específicamente en analizar la comunicación de los parásitos con su hospedador, y solo un número limitado de estudios han analizado la comunicación parásito-parásito. Cuando se realizan estudios en el área de la parasitología, habitualmente se suele considerar a los distintos

parásitos en estudio como células individuales en cultivos en suspensión o en un contexto de infección, sin tener en cuenta que estos microorganismos son comunidades que pueden comunicarse y actuar como un grupo; lo que presenta ciertas ventajas con respecto a las células individuales (Lopez et al., 2011; Oberholzer et al., 2010). La comunicación entre los miembros de las comunidades promueve el desarrollo, la supervivencia, el acceso a nutrientes y mejora el mecanismo de defensa del patógeno contra su hospedador (Ofir-Birin et al., 2017). En *T. brucei*, la comunicación entre parásitos modula la diferenciación mediada por “quorum-sensing” en mamíferos (Mony et al., 2014); así como también la motilidad social exhibida por las formas procíclicas en el intestino medio del insecto vector (Oberholzer et al., 2010). Otro ejemplo interesante sobre la comunicación de los parásitos proviene de estudios realizados en el parásito causante de la malaria, donde se ha demostrado que los parásitos ajustan la proporción de sexos en respuesta a la presencia de genotipos no relacionados en la población (Pollitt et al., 2011).

Al igual que en otros eucariotas, se ha visto que las VEs de parásitos protozoarios se encuentran involucradas en la comunicación celular (Szempruch, Dennison, et al., 2016; Wu et al., 2018). En este contexto, las VEs aisladas de los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* promueven la propagación y supervivencia del parásito (Trocoli Torrecilhas et al., 2009). Mientras que las VEs de *Trypanosoma brucei* promueven la entrada del parásito en las células del hospedador (Atyame Nten et al., 2010; Geiger et al., 2010; Vartak & Gemeinhart, 2007), los exosomas también desempeñan un rol en la comunicación entre los parásitos al afectar la motilidad social y la migración (Eliaz et al., 2017).

### **Comunicación en *Trichomonas vaginalis***

Como ya se ha descrito anteriormente, las VEs liberadas por *T. vaginalis* tienen relevancia en el proceso de interacción del parásito con su hospedador (Artuyants et al., 2020; Nievas et al., 2018; Olmos-Ortiz et al., 2017; Rai & Johnson, 2019; Twu et al., 2013). Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado con profundidad el rol de las VEs en la comunicación parásito-parásito. En este sentido, un trabajo realizado hace ya varios años demostró que la incubación de

parásitos de una cepa poco adherente con sVEs aisladas de cepas de parásitos adherentes puede incrementar la adherencia de parásitos de los parásitos poco adherentes a las células epiteliales de la vagina (Figura 7D). Estos resultados estarían sugiriendo que las VEs podrían tener un rol en la comunicación, y transferencia de información entre cepas (Twu et al., 2013).

En lo que se refiere a la comunicación dependiente del contacto, se ha reportado la presencia de estructuras tipo nanotubos en *Tritrichomonas foetus* (Benchimol et al., 2021a), que tienen un espesor entre 27 nm y 81 nm, y un largo que va desde 73 nm a 2  $\mu$ m (Benchimol et al., 2021a). Estos nanotubos fueron observados conectando dos células, lo que podría estar revelando un rol en la comunicación en *T. foetus* (Benchimol et al., 2021a). En *Trichomonas vaginalis*, se ha reportado la presencia de filopodios en parásitos en estado ameboide (Arroyo et al., 1993) y por microscopía de fluorescencia se pudo determinar que los parásitos se conectaban por medio de filopodios y que las estructuras estaban formados por actina (Lorenzo-Benito et al., 2022). Es importante resaltar, que el estudio de estas estructuras de membrana en *T. vaginalis*, podrá generar conocimientos sobre la comunicación entre parásitos y con las células hospedadoras.

### **Infecciones mixtas de *T. vaginalis*: un problema de salud pública subestimado**

Teniendo en cuenta que la tricomoniasis la enfermedad de transmisión sexual no viral más difundida del mundo y que en muchos casos se establece como infección crónica debido a la ausencia de sintomatología (Sorvillo et al., 2001), es de esperar la existencia de infecciones mixtas, es decir, infecciones causadas por más de una cepa de este parásito. En este contexto, en un trabajo realizado en el año 2012 donde se analizaron 211 muestras de pacientes aisladas alrededor del mundo, se demostró que en el 10,9% de los casos la infección había sido causada por más de una cepa (Conrad et al., 2012). Dada la prevalencia de la infección, estos resultados estarían indicando que un gran número de infecciones son mixtas (Conrad et al., 2012). En estos casos, de existir comunicación entre las distintas cepas, podríamos hipotetizar que en los casos de infecciones mixtas causadas por cepas de *T. vaginalis* con

características fenotípicas diferentes, estas interacciones entre parásitos podrían tener importantes implicancias clínicas. Aunque resulta evidente que los parásitos interactúan con células del hospedador para establecer la infección, hasta el momento se ha subestimado el grado en que la comunicación entre parásitos unicelulares podría estar afectando el proceso de patogénesis. Proponemos entonces como objetivo de este capítulo estudiar la importancia de las VEs y de las protrusiones de membranas en la comunicación parásito-parásito y evaluar si la comunicación entre parásitos podría tener un rol en el proceso de patogénesis de *T. vaginalis*.

## 2.3. Objetivos específicos

Aunque se reconoce que los parásitos interactúan con sus hospedadores para su supervivencia y transmisión, se ha subestimado la comunicación entre parásitos unicelulares. Se han identificado dos formas principales de comunicación célula-célula: dependiente e independiente del contacto. La comunicación independiente del contacto se realiza a través de moléculas solubles, siendo las vesículas extracelulares el foco de investigación reciente debido a su capacidad para alterar el comportamiento de las células receptoras. Por otro lado, la comunicación dependiente del contacto involucra protrusiones de membrana tales como filopodios y citonemas. Los filopodios ya fueron descritos en *T. vaginalis* (Arroyo et al., 1993; Lorenzo-Benito et al., 2022), pero los citonemas no se han descrito en estos parásitos. En este contexto, el objetivo de este capítulo es evaluar la importancia de las vesículas extracelulares y las protrusiones de membrana en la comunicación entre parásitos. Proponemos los siguientes objetivos específicos:

**1. Estudiar si los filopodios y citonemas están involucrados en la comunicación e interacción entre parásitos.** Teniendo en cuenta que los filopodios y citonemas han sido relacionados al proceso de adherencia en otros tipos celulares, evaluaremos si cepas con distinta capacidad de adherencia a células del hospedador poseen distinta cantidad de filopodios y citonemas protruyendo de su superficie. Además, evaluaremos el rol de estas estructuras en la comunicación entre distintas cepas de *T. vaginalis*.

**2. Investigar si las VEs contribuyen a la comunicación celular entre parásitos.** La comunicación entre células puede ser dependiente o independiente del contacto. Evaluaremos el efecto de las VEs liberadas por las diferentes cepas en la formación de filopodios y citonemas. Además, evaluaremos el contenido proteico de las VEs aisladas de diferentes cepas mediante un análisis de LC-MS/MS.



**3. Evaluar el efecto de la comunicación entre cepas en la adherencia a células prostáticas.** Evaluaremos si la adherencia de parásitos a las células del hospedador se puede ver afectada por la presencia de otras cepas.

## **2.4. Metodología**

### **2.4.1. Cultivo de *T. vaginalis***

Las cepas salvajes G3 (ATCC PRA-98; Beckenham, Reino Unido), B7RC2 (ATCC 50167; Greenville, NC, EE. UU.) y CDC1132 (Müller et al., 1988) de *Trichomonas vaginalis* fueron crecidas como se describe en el apartado 1.4.1.

### **2.4.2. Cultivo de células humanas**

Las células BPH-1 humanas de próstata, proporcionadas por el Dr. Simon Hayward (Universidad de NorthShore, EE. UU.) (Jiang et al., 2010), se crecieron en medio RPMI 1640 (Sigma) conteniendo 10 % de suero fetal bovino (SFB; Internegocios, Argentina) con 10 U/ml de penicilina (Invitrogen) y se cultivaron a 37 °C/5% CO<sub>2</sub>.

### **2.4.3. Marcaje fluorescente de parásitos**

Los parásitos se incubaron durante 1 hora a 37 °C en cubreobjetos de vidrio para permitir que se adhieran y posteriormente se fijaron con PAF 4% a temperatura ambiente durante 20 minutos (de Miguel et al., 2010). Una vez fijados, se marcaron con la lectina aglutinina del germen de trigo (WGA) de *Triticum vulgare* conjugada con el fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma). Para ello, los parásitos se incubaron 1:100 WGA/ PBS a 37 °C durante 1 hora, luego se lavaron tres veces con solución de PBS y se montaron con Fluoromont Aqueous Mounting Medium (Sigma). Los parásitos marcados se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer 7 (Zeiss).

### **2.4.4. Microscopía electrónica de barrido**

Los parásitos se incubaron durante 1 hora a 37 °C en cubreobjetos de vidrio y se lavaron con solución de PBS para eliminar los parásitos no adheridos. Luego, se fijaron en 2.5% glutaraldehído en solución tampón de cacodilato 0.1 M, pH 7.2. Luego, se fijaron durante 15 minutos en OsO<sub>4</sub> 1%, se deshidrataron en etanol y se secaron en el punto crítico con CO<sub>2</sub> líquido. Las muestras

deshidratadas se recubrieron con oro-paladio y luego se observaron con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5600, operando a 15 kV. Algunas imágenes fueron coloreadas usando el software Adobe Photoshop (Adobe USA), versión 24.0.1.

#### **2.4.5. Análisis de la capacidad de agregación de parásitos**

La formación de agregados se analizó en parásitos cultivados durante 1 hora en condición de microaerofilia en medio TYM en diferentes concentraciones ( $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  parásitos/ml). Un agregado se definió como un grupo celular de al menos 5 parásitos. La cuantificación de agregados se realizó con un microscopio Nikon TSM (Nikon) con un aumento de 20X. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

#### **2.4.6. Co-incubación directa de parásitos de diferentes cepas**

Los parásitos CDC1132 se marcaron utilizando CellTracker Red CMTPX Dye (ThermoFisher). Luego, los parásitos CDC1132 marcados se co-incubaron durante 1 hora a 37 °C con parásitos G3, B7RC2 y CDC1132 en relación 1:1, 1:2 y 1:9, respectivamente. Los parásitos adheridos a los cubreobjetos se fijaron y se tiñeron con WGA como se describió previamente. El número de parásitos CDC1132 que contenían filopodios y citonemas, visualizados como los que tenían doble marcaje (rojo y verde), se analizaron utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer 7 (Zeiss).

#### **2.4.7. Co-incubación indirecta de parásitos de diferentes cepas**

Los parásitos de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 se co-cultivaron utilizando insertos de 24 pocillos de poliéster (tamaño de poro de 1  $\mu\text{m}$ ; Biofil). Los parásitos CDC1132 se incubaron sobre cubreobjetos de vidrio en el fondo de cada pocillo y se expusieron a parásitos de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 colocados en los insertos (relación de parásitos 1:2 pocillo:inserto) durante 1 hora a 37 °C. Luego, los parásitos CDC1132 adheridos a los cubreobjetos se

marcaron con WGA y se analizó la formación de filopodios y citonemas utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer 7 (Zeiss).

#### **2.4.8. Aislamiento de VEs**

El aislamiento de VEs de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 se realizó como se describió en la sección 1.4.5.

#### **2.4.9. Cuantificación de proteínas totales**

La cuantificación de las muestras de VEs de las diferentes cepas, se realizó de la misma manera que se describió en la sección 1.4.7.

#### **2.4.10. Incubación de parásitos con VEs**

Se incubaron parásitos de la cepa CDC1132 en cubreobjetos de vidrio con 10 µg de VEs aisladas de diferentes las cepas, y con un volumen equivalente de a solución de PBS como control (solución donde se encontraban resuspendidas las VEs) durante 1 hora a 37 °C en una placa de 24 pocillos. Luego, se realizaron lavados con PBS y se fijaron con una solución de 4% de PAF durante 20 minutos. Los parásitos adheridos a los cubreobjetos se marcaron con WGA como se describió anteriormente y se examinó la formación de citonemas y filopodios utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axio Observer 7 (Zeiss).

#### **2.4.11. Análisis de espectrometría de masas**

Las muestras enriquecidas con VEs se resuspendieron en un volumen mínimo de tampón de digestión (Tris-HCl 100 mM, pH 8, urea 8 M). Las proteínas se redujeron y alquilaron mediante la adición secuencial de tris (2-carboxietil) fosfina 5 mM y yodoacetamida 10 mM. Luego, dichas muestras se digirieron con Lys-C (Princeton Separations) y tripsina (Promega) (Florens et al., 2006). En primer lugar, se añadió proteasa Lys-C [≈1:50 (p/p) proporción de enzima:sustrato] a cada muestra y se incubó durante 4 hora a 37 °C con agitación suave. Luego, los productos de digestión se diluyeron en urea 2 M, se agregó tripsina a una

proporción final de enzima:sustrato de 1:20 (p/p) y se incubaron durante 8 horas a 37 °C con agitación suave. Las digestiones se detuvieron mediante la adición de ácido fórmico hasta llegar a una concentración final de 5%. Los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente de la resina y se analizaron mediante espectrometría de masa. Luego, las muestras se analizaron utilizando una plataforma LC-MS/MS como se describió anteriormente (Kaiser & Wohlschlegel, 2005; Wohlschlegel, 2009). Brevemente, las muestras digeridas se cargaron en una columna capilar de sílice fundida con una punta de electropulverizador de 5 µm y se empaquetaron internamente con 18 cm de partículas Luna C18 3 µM (Phenomenex). A continuación, la columna se colocó en línea con un espectrómetro de masas Q-exactive (ThermoFisher) y los péptidos se fraccionaron utilizando un gradiente de acetonitrilo creciente. Los péptidos se eluyeron directamente en el espectrómetro de masas, donde se recogieron los espectros MS/MS. La estrategia de adquisición espectral dependiente de los datos consistió en un ciclo repetitivo de un espectro MS completo (resolución = 70 000) seguido de MS/MS de los 12 iones precursores más intensos del escaneo MS completo (resolución = 17 500) (Kelstrup et al., 2012). Los datos sin procesar y los análisis de espectros se realizaron con el software MaxQuant (Tyanova et al., 2016). Para la identificación de proteínas, se realizó una búsqueda en una base de datos de proteínas fasta que constaba de todos los marcos de lectura abiertos predichos descargados de TrichDB el 9 de noviembre de 2022 (Amos et al., 2022), concatenados en una base de datos señuelo en la que se indicaba la secuencia de aminoácidos de cada entrada. Se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda: (1) la tolerancia al ion precursor fue de 20 ppm; (2) la tolerancia a iones de fragmentos fue de 20 ppm; (3) la carbamidometilación de cisteína se consideró como una modificación estática; (4) los péptidos deben ser completamente trípticos; y (5) no se tuvieron en cuenta las escisiones omitidas. Las tasas de falsos positivos para las identificaciones de péptidos se estimaron mediante un enfoque de base de datos señuelo y luego se filtraron mediante el algoritmo DTASelect (Cociorva et al., 2006; Elias & Gygi, 2007; Tabb et al., 2002). Las proteínas identificadas por al menos dos péptidos únicos completamente trípticos, cada uno con una tasa de falsos positivos de menos del 5 %, se consideraron presentes en la muestra. Se analizaron de forma independiente tres conjuntos diferentes de muestras

enriquecidas con VEs aisladas de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132. Las proteínas presentes en la fracción de VEs se identificaron mediante la herramienta BLAST (Herramienta de búsqueda de alineación local básica) y se clasificaron mediante el enriquecimiento del término GO según el sistema de clasificación PANTHER (Mi et al., 2013).

#### **2.4.12. Ensayo de adherencia**

Se llevó a cabo una versión modificada de un ensayo *in vitro* para cuantificar la adherencia de *T. vaginalis* a células del hospedador descrito previamente (Bastida-Corcuera et al., 2005). Brevemente, las células BPH-1 se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos con medio de cultivo RPMI (Invitrogen), y se cultivaron hasta la confluencia a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Por otro lado, parásitos de las cepas CDC1132 o G3 se marcaron con CellTracker Blue CMAC (Invitrogen) y se incubaron con una monocapa confluyente de células BPH-1 (proporción 1:3 parásito-célula hospedadora) en presencia de otras cepas cargadas en insertos transwell con filtros de tamaño de poro de 1 µm. Utilizando este esquema, se evaluó el efecto de la co-incubación con distintas cepas de parásitos (G3, B7RC2 y CDc1132) en la adherencia de las cepas CDC1132 o G3 a células del hospedador (células prostáticas BPH1) durante 30 minutos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. Los cubreobjetos se lavaron posteriormente con PBS, se fijaron con PAF 4 % y se montaron en portaobjetos con medio de montaje acuoso Fluoromont (Sigma). La cuantificación de parásitos fluorescentes adheridos a las células huésped se midió utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer 7.

#### **2.4.13. Gráficos y análisis estadísticos**

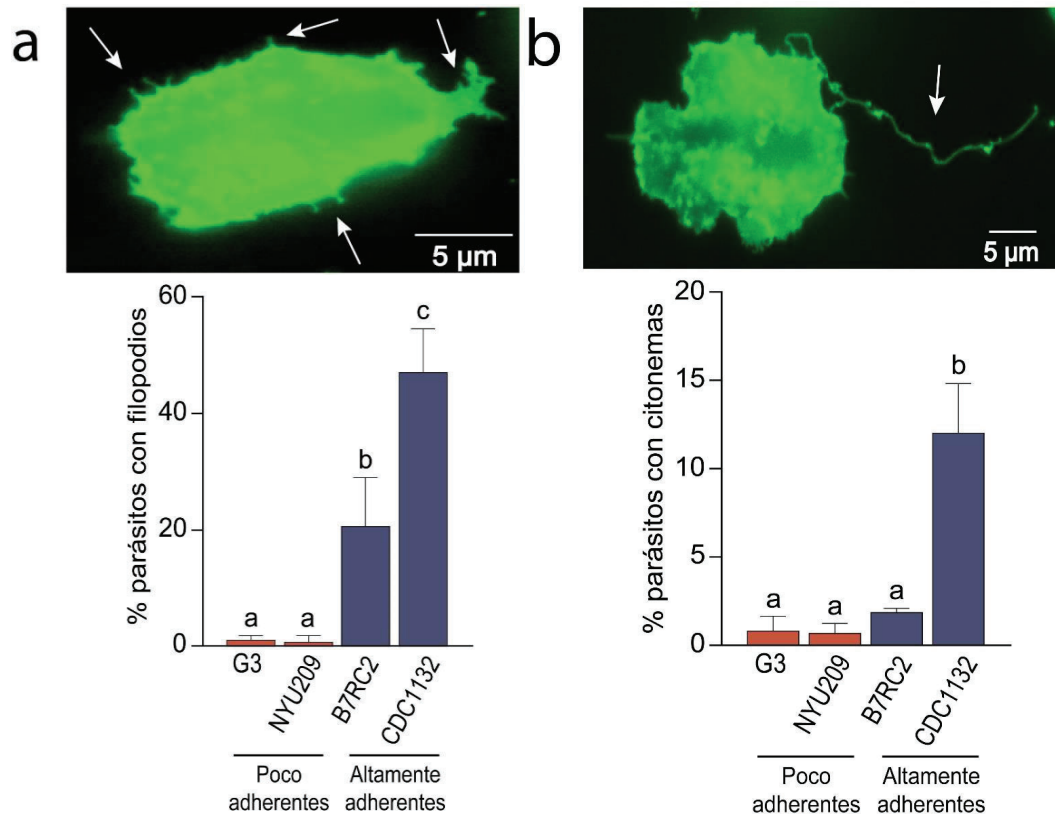
Las consideraciones estadísticas específicas y las pruebas utilizadas se describen en la sección 1.4.13.

## 2.5. Resultados

### 2.5.1. Los parásitos de cepas adherentes de *T. vaginalis* poseen más protrusiones de membrana en su superficie que parásitos poco adherentes

Las distintas cepas de *Trichomonas vaginalis* presentan grandes diferencias fenotípicas en cuanto a su capacidad de adherencia y citotoxicidad (Figura 3) (Lustig et al., 2013). La adherencia a las células del hospedador es un proceso multifactorial clave para el establecimiento y mantenimiento de la infección; y en otros tipos celulares se ha demostrado que los filopodios contribuyen en la regulación de dicha adherencia celular (Arjonen et al., 2011; Gallop, 2020; Jacquemet et al., 2015; Vasioukhin & Fuchs, 2001). Un trabajo reciente demostró que *T. vaginalis* forma estructuras de tipo filopodios (Lorenzo-Benito et al., 2022), pero se desconoce el rol de estas estructuras en el proceso de interacción del parásito con células del hospedador. Para comprender el rol de los filopodios en *T. vaginalis*, inicialmente decidimos evaluar la presencia de protrusiones de membrana en cepas del parásito con distinta capacidad de adherencia a las células hospedadoras. Evaluamos la cantidad de parásitos que presentaban filopodios en su superficie en dos cepas de *T. vaginalis* poco adherentes (cepas G3 y NYU209) y en dos cepas altamente adherentes a las células del hospedador (cepas B7RC2 y CDC1132) mediante microscopía de fluorescencia utilizando una tinción con una lectina que tiñe la superficie del parásito (WGA) (Figura 2.4a). Nuestros resultados demostraron que las cepas adherentes presentaban una mayor cantidad de filopodios que las cepas poco adherentes. Sin embargo, al analizar las imágenes detalladamente observamos la presencia de otro tipo de estructuras que protruyen de la membrana, similares a los citonemas descritos en otros tipos celulares. Estas estructuras, se han descrito en otros organismos como filopodios especializados generalmente asociados a funciones relacionadas con la comunicación intercelular (Kornberg & Roy, 2014b). Teniendo en cuenta estas observaciones decidimos evaluar la presencia de citonemas en las cuatro cepas de *T. vaginalis*. Como se puede observar en la figura 2.4b, los parásitos de cepas adherentes poseen mayor cantidad de citonemas que aquellos parásitos de cepas poco adherentes (Figura 2.4b). Estas extensiones tubulares parecen tener extremos cerrados y se pueden

ver protruyendo a partir del cuerpo celular, así como también de la región donde emergen los flagelos (Figuras 2.5 y 2.6).

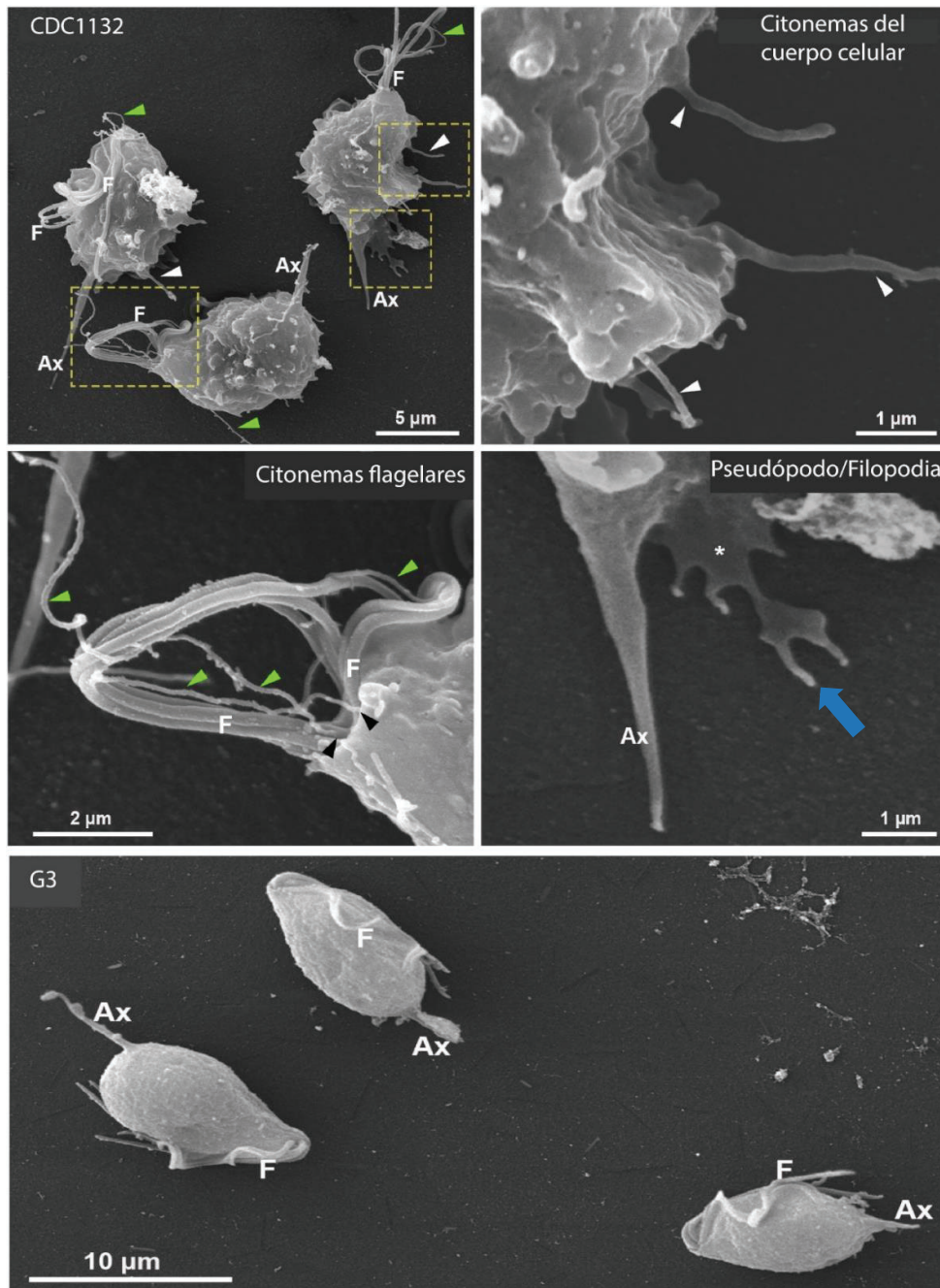


**Figura 2.4. Las cepas más adherentes de *T. vaginalis* tienen mayor cantidad de protuberancias de membrana.** Cuatro cepas diferentes de parásitos: 2 cepas poco adherentes (G3 y NYU209) y 2 cepas muy adherentes (B7RC2 y CDC1132) fueron marcadas con la lectina WGA conjugada a FITC (verde). Se cuantificó el porcentaje de parásitos que contenían filopodios (a) y citonemas (b). Se realizaron 3 experimentos independientes y se cuantificaron 100 parásitos al azar. Los datos se expresan como porcentaje de parásitos con filopodios o citonemas  $\pm$  desvío estándar (DE). Se utilizó ANOVA seguido de Tukey para determinar diferencias significativas.

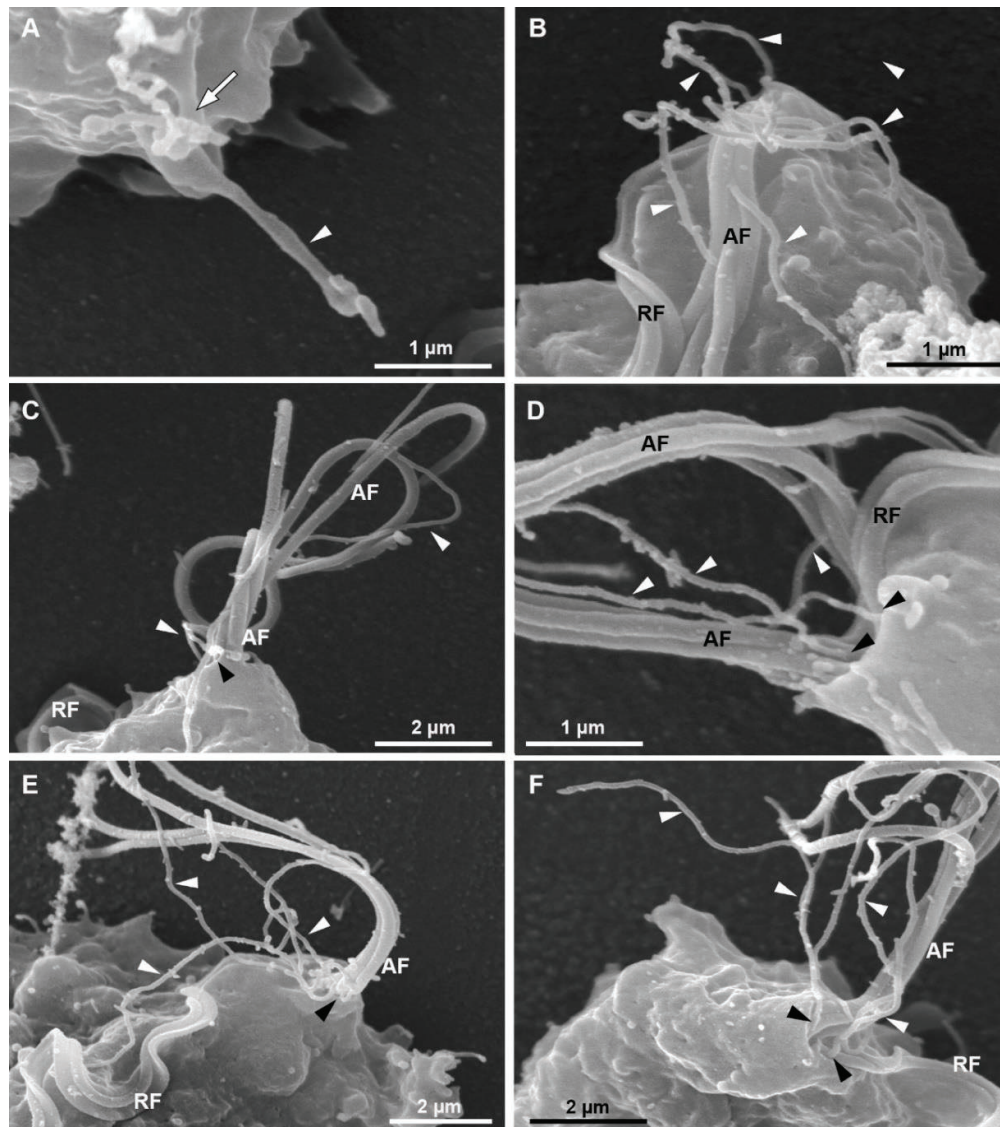
Las extensiones tubulares del cuerpo celular son heterogéneas, con un diámetro que varía de 70 nm a 540 nm y algunas de ellas están bifurcadas (Figuras 2.5 y 2.6). La longitud puede alcanzar  $\approx 5 \mu\text{m}$  y sus características ultraestructurales son similares a las proyecciones flagelares descritas previamente en *Tritrichomonas foetus* (Benchimol et al., 2021b). En conjunto, estos resultados demuestran que *T. vaginalis* contiene diferentes tipos de extensiones de membrana que surgen de su superficie y sugieren que su abundancia depende, al menos en parte, del fenotipo de la cepa. En este sentido, teniendo en cuenta que los parásitos de la cepa CDC1132 poseen mayor cantidad de filopodios y



citonemas decidimos continuar nuestros ensayos utilizando esta cepa como modelo de estudio.



**Figura 2.5. Los parásitos CDC1132 poseen protrusiones que se originan en la superficie celular.** Análisis de microscopía electrónica de barrido de parásitos CDC1132 y G3 demuestra que los parásitos adherentes (CDC1132) poseen citonemas que protruyen del cuerpo celular (flecha blanca), así como también desde el flagelo (flecha verde) y desde la misma región donde emergen los flagelos (flechas negras). Se destaca también la formación de pseudópodos (\*) y filopodios (flecha azul). No se observaron extensiones en la superficie de los parásitos poco adherentes (G3). F: flagelo; Ax: axostilo.

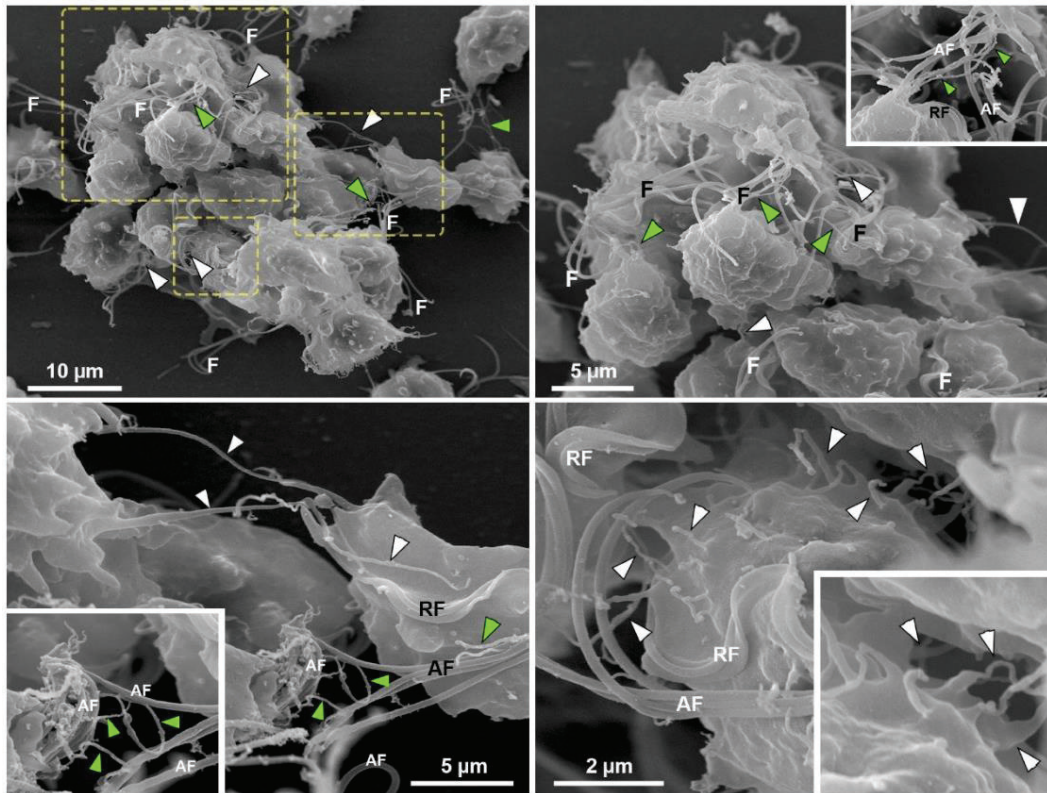


**Figura 2.6. Los citonemas se encuentran ramificados.** Utilizamos microscopía electrónica de barrido para la observación detallada de los citonemas. Se puede observar la formación de citonemas tubulares no ramificados que sobresalen del cuerpo celular (**A**) así como también citonemas ramificados que emergen desde los flagelos (flechas blancas) (**B-F**). Estos citonemas se originan en la misma región donde emergen los flagelos anteriores (AF) y recurrente (RF) (puntas de flecha negras).

### 2.5.2. La presencia de citonemas se asocia a la formación de agregados celulares de parásitos

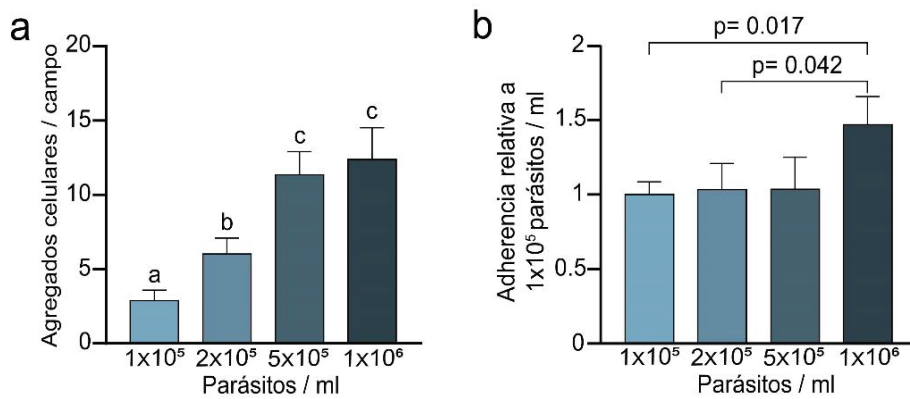
Los agregados celulares o "*clumps*" son una agrupación de al menos cinco parásitos que forman habitualmente las cepas altamente adherentes, pero no así las cepas de baja adherencia (Coceres et al., 2015; Lustig et al., 2013). En base a esta observación se ha propuesto que la capacidad de formar *clumps* es una medida indirecta de la capacidad de adherencia de los parásitos a las células del

hospedador (Coceres et al., 2015). Al analizar la cepa adherente CDC1132 por microscopía electrónica de barrido observamos que los parásitos que formaban *clumps* estaban conectados por citonemas (Figura 2.7).



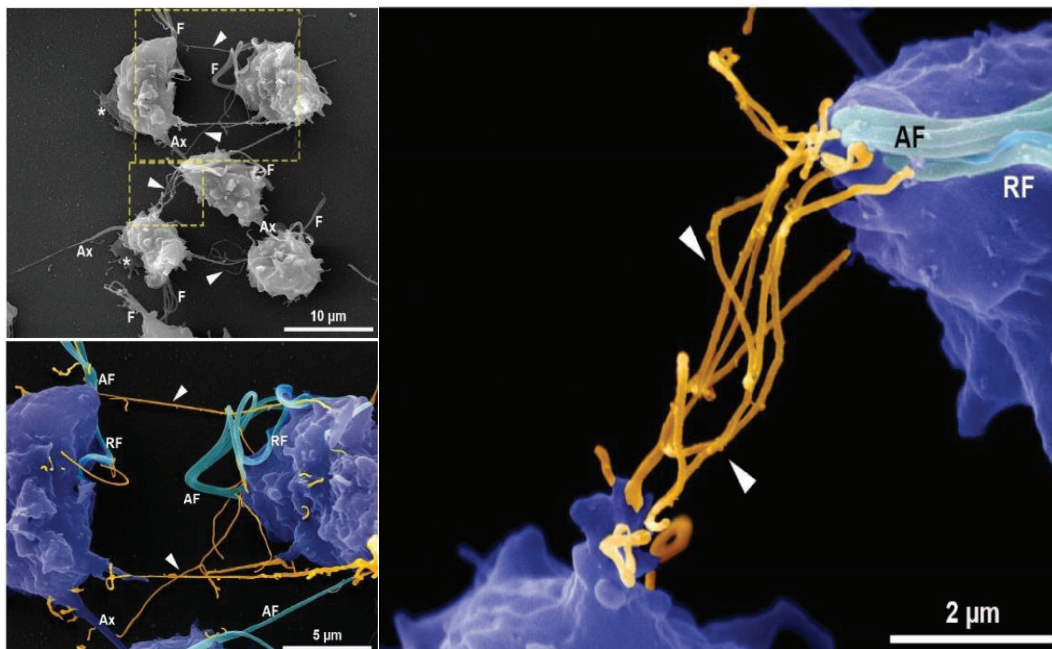
**Figura 2.7. Presencia de citonemas dentro de los agregados celulares.** Análisis de microscopía electrónica de barrido de los agregados celulares (*clumps*) formados por los parásitos CDC1132. Las flechas verdes destacan los citonemas en la base de los flagelos, y las flechas blancas los citonemas que emergen del cuerpo celular. F: flagelos; AF: flagelos anteriores; RF: flagelo recurrente.

La formación de *clumps* en cepas adherentes es un proceso dependiente de la concentración celular. Habitualmente la formación de dichos agregados comienza cuando la concentración de parásitos es de  $5 \times 10^5$  parásitos/ml (Figura 2.8a). Para evaluar si la formación de citonemas podría estar relacionada con la agregación parasitaria, nos propusimos evaluar la correlación de la formación de citonemas con la aparición de *clumps*; para lo cual analizamos la cantidad de parásitos que poseían citonemas cuando eran cultivados en distintas concentraciones (Figura 2.8a). Nuestros resultados mostraron que a concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/ml (concentración en la que se forman una gran cantidad de "*clumps*"), encontramos mayor cantidad de parásitos con citonemas en su superficie (Figura 2.8b).



**Figura 2.8. La formación de citonemas se correlaciona con la formación de agregados celulares.** (a) Cuantificación de la formación de “clumps” a distintas concentraciones de parásitos. Se contaron 20 campos por duplicado en 3 experimentos independientes. Los agregados celulares fueron definidos como un grupo de más de 5 parásitos. Se utilizó ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey para determinar diferencias significativas. (b) Cuantificación de parásitos conteniendo citonemas a diferentes concentraciones. Se realizaron 3 experimentos independientes por duplicado y se contaron aleatoriamente 100 parásitos por muestra. Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

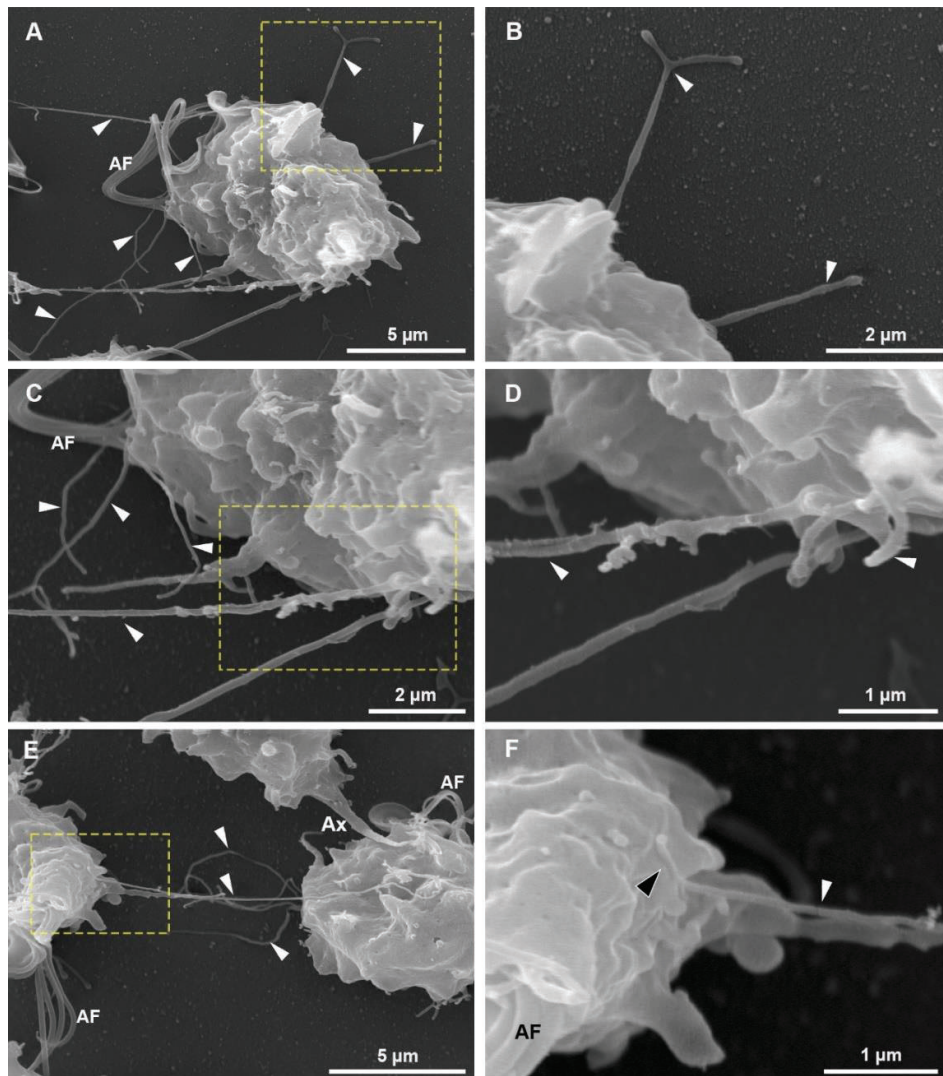
Estos hallazgos sugieren que los citonemas podrían estar involucrados en la comunicación parásito-parásito. Avalando esta hipótesis, por microscopía electrónica de barrido frecuentemente observamos parásitos conectados por citonemas (Figuras 2.9 y 2.10).



**Figura 2.9. Los citonemas conectan a los parásitos.** En micrografías electrónicas de barrido pudimos observar parásitos CDC1132 (azules) conectándose por medio de

citonemas (anaranjado). F: flagelos; AF: flagelos anteriores; RF: flagelo recurrente; Ax: axostilo. Las puntas de flechas blancas indican los citonemas entre parásitos.

Estos citonemas poseen las puntas cerradas, las cuales se encuentran frecuentemente en contacto con la superficie de parásitos adyacentes (Figura 2.10).

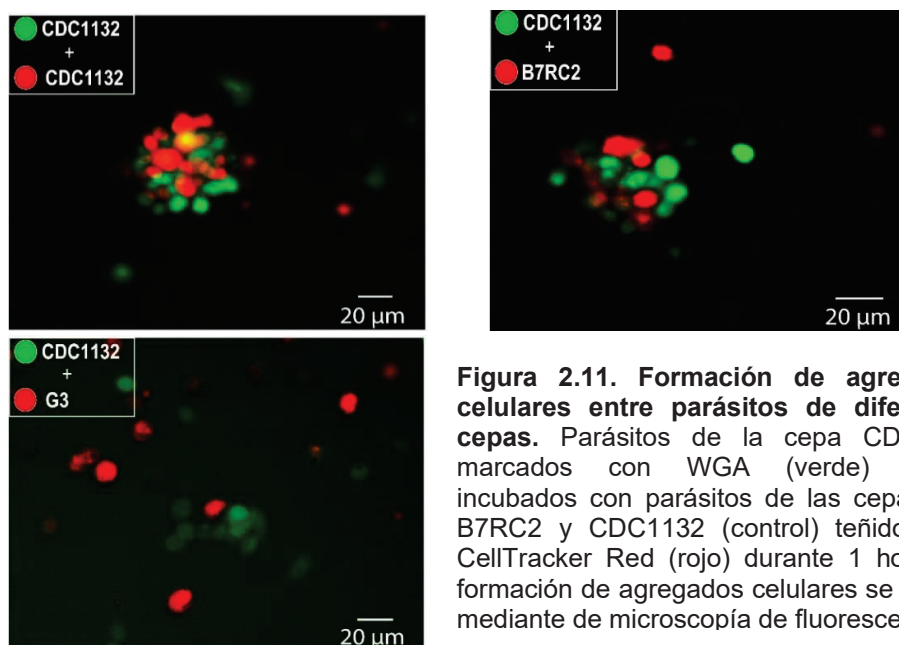


**Figura 2.10. Citonemas ramificados conectan a los parásitos.** En micrografías electrónicas de parásitos en contacto con otros parásitos se pueden observar citonemas no ramificados (A-D) y citonemas ramificados conectando parásitos (E y F). En (f), la punta cerrada del citonema se ve en contacto con la superficie del parásito adyacente (flechas negras). AF: flagelos anteriores; RF: flagelo recurrente.

En resumen, nuestros resultados sugieren que los citonemas podrían desempeñar una función importante en la formación de "clumps" y en la comunicación entre los parásitos.

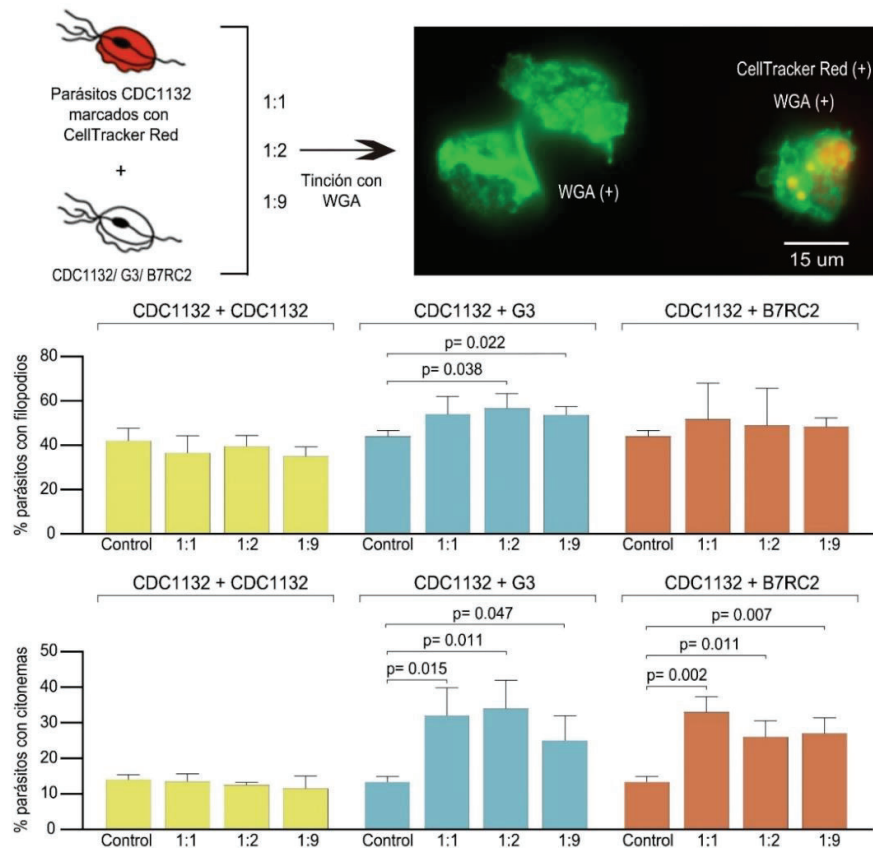
### 2.5.3. La interacción entre diferentes cepas induce la formación de protrusiones de membrana

En un estudio donde se aislaron 211 muestras de pacientes infectados con *T. vaginalis* observaron que en el 10.9% de los casos, las infecciones eran mixtas, es decir, causadas por más de una cepa de este parásito (Conrad et al., 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes y nuestros resultados recientes, hipotetizamos que las distintas cepas del parásito podrían ser capaces de interactuar y comunicarse, y como consecuencia de esta interacción podrían existir cambios en el comportamiento de una o ambas cepas. Inicialmente, para evaluar si las diferentes cepas de *T. vaginalis* eran capaces de interactuar entre sí, los parásitos CDC1132 se teñieron con un compuesto fluorescente éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, verde) y se co-incubaron durante una hora con parásitos de una cepa altamente adherente (B7RC2); y paralelamente con parásitos de una cepa poco adherente (G3), ambos teñidos con CellTracker CMTPIX Dye (rojo). Como control, los parásitos CDC1132 (verdes) también fueron incubados con parásitos CDC1132 teñidos con CellTracker CMTPIX Dye (rojo). Los resultados obtenidos (Figura 2.11) indicaron que los parásitos CDC1132 son capaces de interactuar y formar agregados celulares con parásitos de las cepas B7RC2 o G3. Dado que la cepa G3 por lo general no forma agregados (Coceres et al., 2015), era esperable la formación de “clumps” más pequeños al ser incubada con parásitos de la cepa CDC1132.



**Figura 2.11. Formación de agregados celulares entre parásitos de diferentes cepas.** Parásitos de la cepa CDC1132 marcados con WGA (verde) fueron incubados con parásitos de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 (control) teñidos con CellTracker Red (rojo) durante 1 hora. La formación de agregados celulares se evaluó mediante de microscopía de fluorescencia.

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos que sugieren que los citonemas podrían estar involucrados en la comunicación entre diferentes cepas de *T. vaginalis*, decidimos evaluar si la formación de citonemas de la cepa CDC1132 se podría ver afectada por la presencia de una cepa diferente. Para este análisis, parásitos de la cepa CDC1132 fueron teñidos con CellTracker CMTPX Dye (rojo) e incubados durante 1 hora con distintas cantidades de parásitos G3, B7RC2 y CDC1132 (control) sin teñir (relaciones 1:1; 1:2; 1:9). Posteriormente, todos los parásitos se tiñeron con WGA y evaluamos la presencia de filopodios y citonemas en la cepa CDC1132 (parásitos que poseen doble marcación rojo/verde) mediante microscopía de fluorescencia. Si bien no se observó un cambio en la formación de filopodios en los parásitos de la cepa CDC1132 tras la exposición a parásitos de la cepa G3 o B7RC2, la formación de citonemas de los parásitos CDC1132 se vio significativamente afectada por la presencia de una cepa diferente en comparación con la co-incubación con parásitos de la misma cepa (control) (Figura 2.12).



**Figura 2.12. La presencia de otras cepas afecta la formación de citonemas en parásitos de la cepa CDC1132.** Parásitos de la cepa CDC1132 teñidos con CellTracker

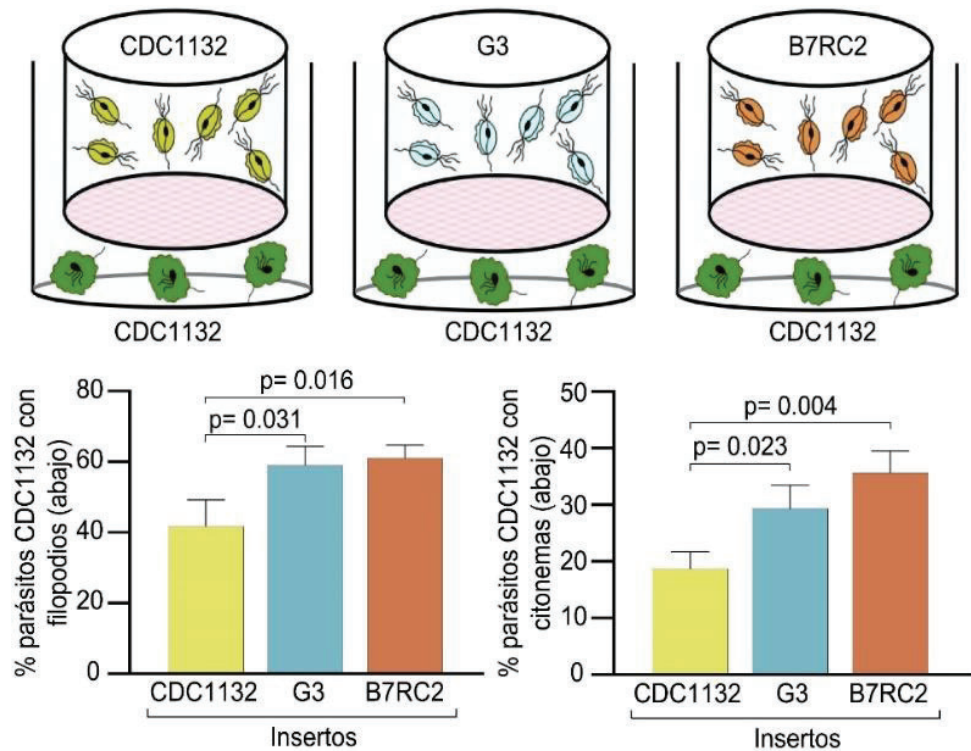
Red (rojo) se co-incubaron con distintas relaciones (1:1, 1:2 y 1:9) de parásitos de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 (control) durante 1 h. Luego, todos los parásitos fueron teñidos con WGA (verde) y se cuantificó el porcentaje de parásitos CDC1132 (marca roja y verde) que contenían filopodios y citonemas en su superficie. Los datos se expresan como el porcentaje de parásitos con filopodios o citonemas  $\pm$  desvío estándar (DE). Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que la comunicación entre parásitos de diferentes cepas de *T. vaginalis* podría estar mediada por citonemas.

#### **2.5.4. Las vesículas extracelulares están involucradas en la comunicación entre parásitos de diferentes cepas**

Con el objetivo de evaluar si la comunicación entre parásitos era dependiente o independiente del contacto, realizamos un ensayo de co-incubación de parásitos de distintas cepas utilizando un sistema de transwell, el cual contiene insertos que poseen una membrana porosa de 1  $\mu\text{m}$  impide el contacto directo entre las distintas cepas de parásitos (Figura 2.13). Teniendo en cuenta el tamaño del poro del filtro, este sistema permite que los factores secretados y las vesículas extracelulares menores a 1  $\mu\text{m}$  atraviesen la membrana, pero no así los parásitos cuyo diámetro es de 10 a 15  $\mu\text{m}$ . Con este diseño experimental, los parásitos de la cepa CDC1132 fueron co-incubados con los parásitos G3, B7RC2 y CDC1132 (control) durante una hora (Figura 2.13). Una vez finalizada la co-incubación se tiñeron con WGA para cuantificar el porcentaje de parásitos que poseían filopodios y/o citonemas mediante microscopia de fluorescencia (Figura 2.13). Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en el número de parásitos con citonemas y filopodios cuando las cepas G3 o B7RC2 se cargan en los insertos en comparación con el control (inserto cargado con parásitos de la cepa CDC1132). Estos resultados indican que el efecto sobre la formación de citonemas es, al menos en parte, independiente del contacto.

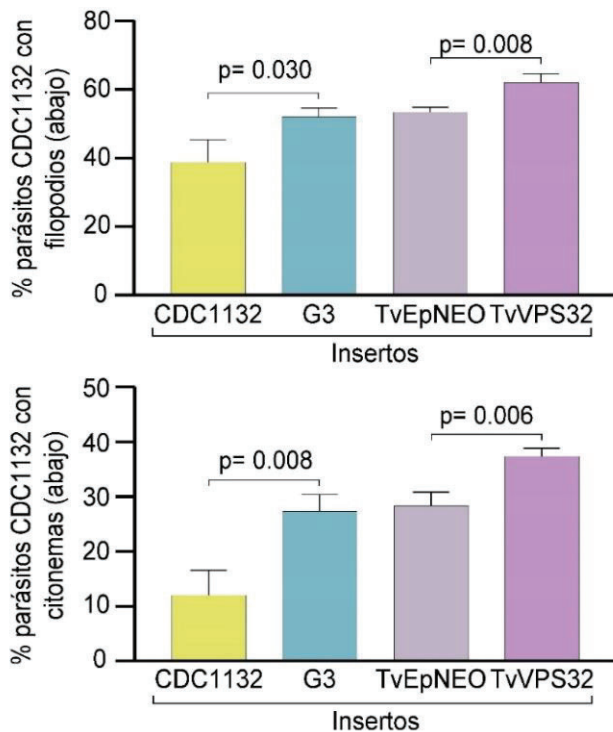




**Figura 2.13. La interacción independiente del contacto induce la formación de protrusiones de las membranas.** Ensayo de co-incubación de las distintas cepas utilizando insertos de cultivo celular con una membrana de 1  $\mu\text{m}$ . Parásitos de la cepa CDC1132 fueron colocados sobre cubreobjetos (abajo) y parásitos de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 (control) en los insertos. Luego de 1 h de incubación los parásitos de la cepa CDC1132 adheridos a los cubreobjetos fueron teñidos con WGA (verde) y se cuantificó el porcentaje de parásitos con filopodios y citonemas. Los datos se expresan como porcentaje de parásitos con filopodios y citonemas  $\pm$  desvío estándar (DE). Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Teniendo en cuenta que las VEs han sido descritas como mediadores de la comunicación en distintos tipos celulares y que nuestros resultados indican que el efecto en la formación de citonemas es causado por algún factor liberado por los parásitos capaz de atravesar el filtro, planteamos que las VEs liberadas podrían ser responsables de esta respuesta diferencial en la formación de citonemas en los parásitos receptores. Para evaluar si efectivamente las VEs eran mediadores de la comunicación entre las distintas cepas de *T. vaginalis*, utilizamos un sistema de transwell para co-incubar parásitos de la cepa CDC1132 con parásitos de la cepa G3 transfectados con la proteína TvVPS32, los cuales liberan mayor cantidad de VEs al compararlos con los parásitos de la misma cepa transfectados con el plásmido vacío (EpNEO). Este experimento nos permitiría evaluar fehacientemente si la liberación de VEs estaría

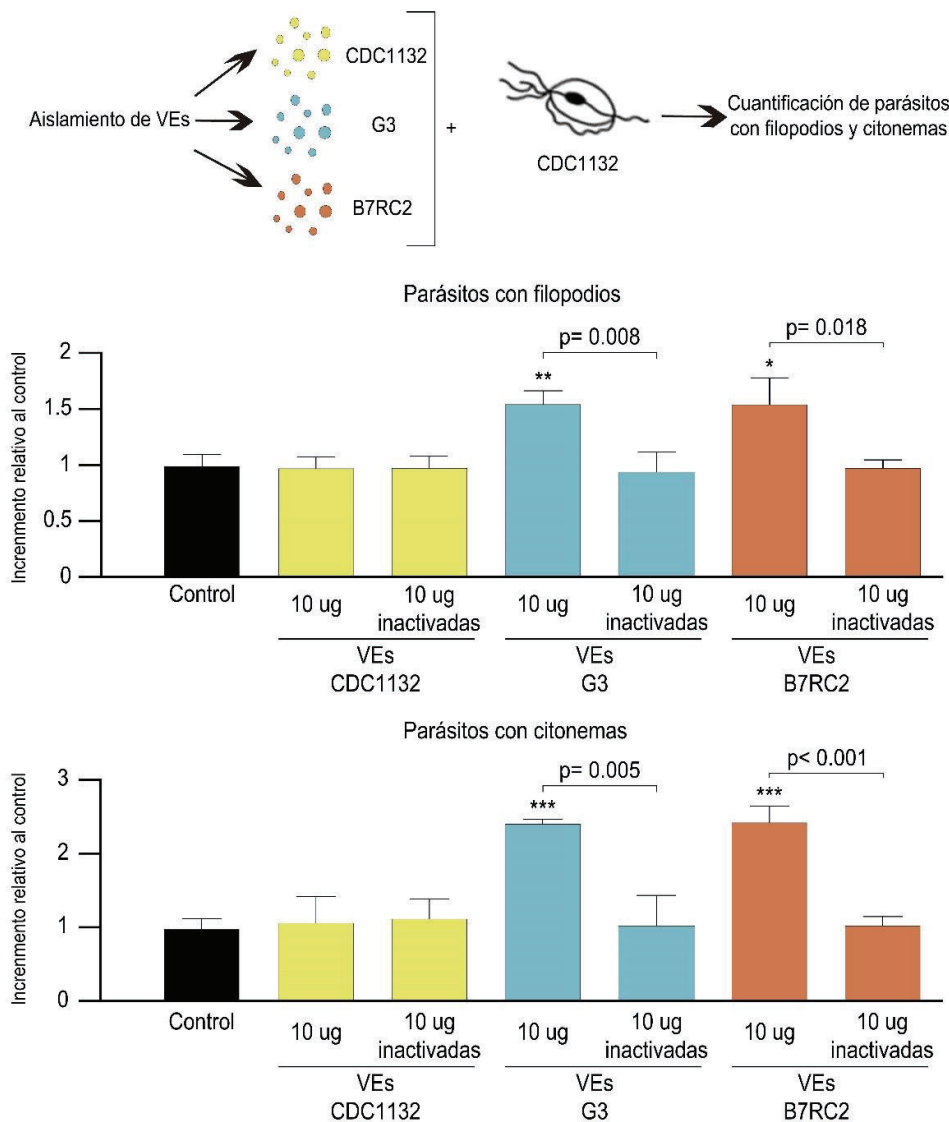
relacionada con el aumento en el número de filopodios y citonemas observado en los parásitos receptores. Utilizamos un diseño experimental similar al descrito anteriormente en el que se colocaron en los insertos no solo los parásitos CDC1132 (control) y G3, sino también parásitos de la cepa G3 transfectados con TvVPS32 y TvEpNEO (plásmido vacío) (Figura 2.14). Los resultados indicaron que la co-incubación con los parásitos TvVPS32 aumentó significativamente el número de parásitos CDC1132 con filopodios y citonemas en comparación con los parásitos control TvEpNEO; sugiriendo que las VEs podrían ser los factores responsables, al menos en parte, del incremento de la formación de estas estructuras de membrana en los parásitos receptores. Es importante destacar que cuando los parásitos CDC1132 fueron incubados con parásitos TvEpNEO (transfectados con un plásmido vacío) se observó un incremento similar al observado con los parásitos de la cepa G3 salvaje, y ambos fueron mayores que la incubación con los parásitos CDC1132 en los insertos.



**Figura 2.14. La mayor liberación de VEs posee un efecto sobre la formación de protrusiones de la membrana.** Parásitos de la cepa CDC1132 (abajo) fueron co-incubados con parásitos de las cepas G3, CDC1132 (control) así como también G3 transfectados con TvEpNEO y TvVPS32 en los insertos durante 1 h. Luego, los parásitos de la cepa CDC1132 adheridos a los cubreobjetos se tiñeron con WGA (verde) y se cuantificó el porcentaje de parásitos con filopodios y citonemas. Los datos se expresan como porcentaje de parásitos con filopodios y citonemas  $\pm$  desvío estándar (DE). Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Luego para confirmar que los efectos observados se debían a las VEs de las diferentes cepas, se aislaron las VEs de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 (control) utilizando el protocolo descrito en la Figura 1.6; y 10  $\mu$ g de VEs aisladas de cada una de las cepas fueron incubadas con parásitos de la cepa CDC1132

para evaluar el efecto en la formación de citonemas y filopodios (Figura 2.15). La incubación con 10 µg de VEs de las cepas G3 o B7RC2 aumentó significativamente la cantidad de parásitos CDC1132 con citonemas y filopodios, mientras que la incubación con 10 µg de VEs aisladas de la cepa CDC1132 no tuvo este efecto. Como control, se utilizaron parásitos incubados con PBS, así como también incubación con VEs de las diferentes cepas inactivadas mediante autoclave (Schulz et al., 2020). Estos resultados sugieren que el contenido proteico de las VEs podría ser diferente y dependiente de la cepa de origen.

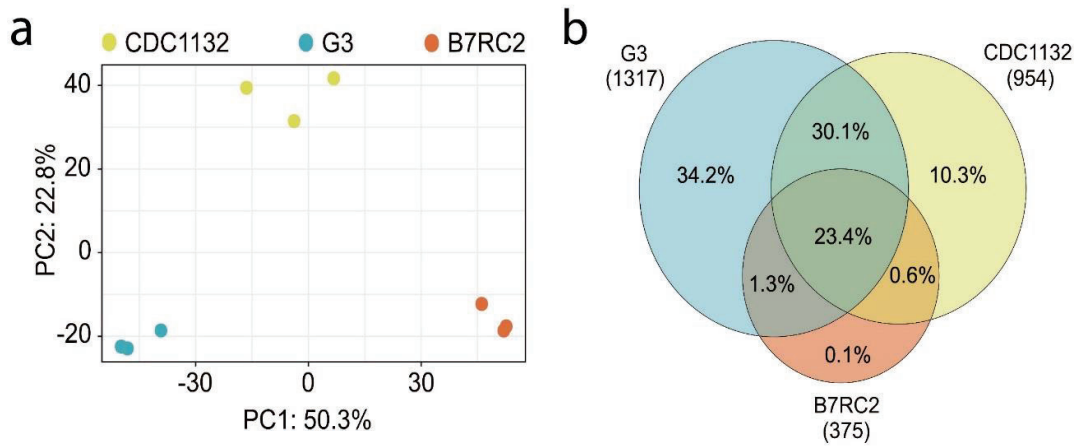


**Figura 2.15. Las VEs de diferentes cepas inducen la formación de filopodios y citonemas en los parásitos CDC1132.** 10 µg de VEs aisladas de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 se incubaron parásitos de la cepa CDC1132 durante 1 h. Como control se realizó una incubación de los parásitos con PBS (buffer de resuspensión de VEs) así como también

con 10 µg de VEs inactivadas. Los parásitos fueron luego teñidos con WGA y se cuantificó el porcentaje de parásitos con filopodios y citonemas. Los datos se expresan como un aumento de veces relativo al control  $\pm$  desvío estándar (DE). Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

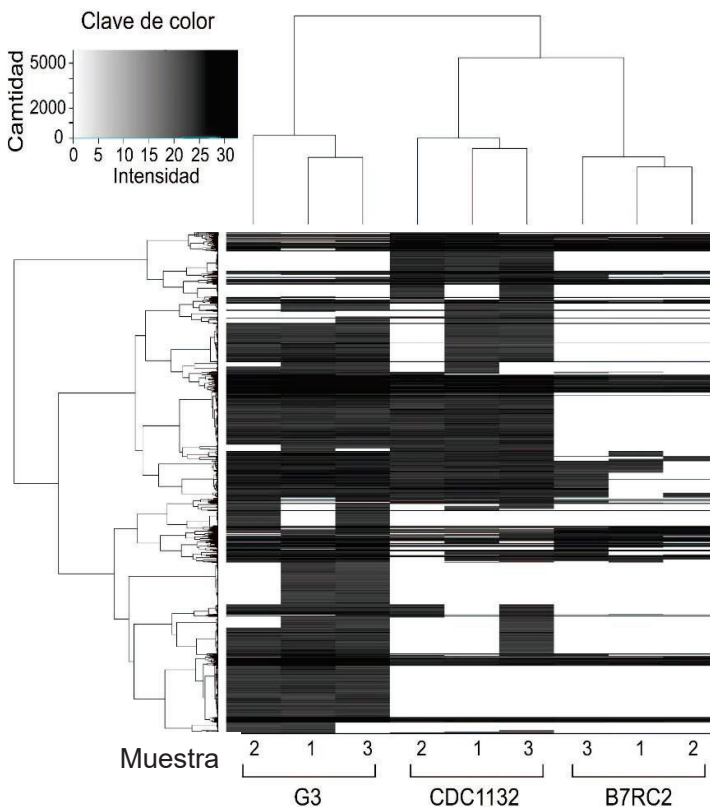
### **2.5.5. El contenido proteico de las VEs es dependiente de la cepa de origen**

Para explicar la respuesta diferencial observada en la formación de citonemas causada por la incubación con VEs aisladas de distintas cepas (Figura 2.15), se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masa (LC-MS/MS) para evaluar el contenido proteico de las vesículas extracelulares aisladas de las distintas cepas. Se analizaron tres muestras independientes conteniendo 30 µg de VEs aisladas de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 y se identificaron 1317, 375 y 954 proteínas en las muestras de cada cepa, respectivamente (Tabla suplementaria 2.1: “Proteoma de VEs de diferentes cepas *Trichomonas vaginalis*”). Posteriormente, el análisis de componentes principales (PCA) confirmó que las muestras enriquecidas de VEs de las cepas eran diferentes (Figura 2.16a). Para evaluar la calidad de los aislamientos y del proteoma, se compararon las proteínas encontradas en este estudio con las proteínas detectadas tanto en el secretoma reportado de *T. vaginalis* (Štáfková et al., 2018) como con aquellas detectadas en el proteoma de superficie (de Miguel et al., 2010); así como también se compararon con los análisis proteómicos de VEs de *T. vaginalis* publicados previamente (Govender et al., 2020; Nievas et al., 2018; Rada et al., 2022; Twu et al., 2013). Validando nuestros datos, los resultados indicaron que el 89% de las proteínas que detectamos se encontraban en dichos proteomas (Tabla suplementaria 2.1: “Proteoma de VEs de diferentes cepas *Trichomonas vaginalis*”). Llamativamente, aunque los aislamientos de VEs se hayan realizado a partir de la misma cantidad de parásitos, la cantidad de proteínas identificadas en el proteoma de G3 y CDC1132 fue consistentemente mayor que la cantidad de proteínas presentes en las muestras de B7RC2. Los resultados del proteoma indicaron que sólo 346 proteínas se comparten entre las VEs de las diferentes cepas (Figura 2.16b).



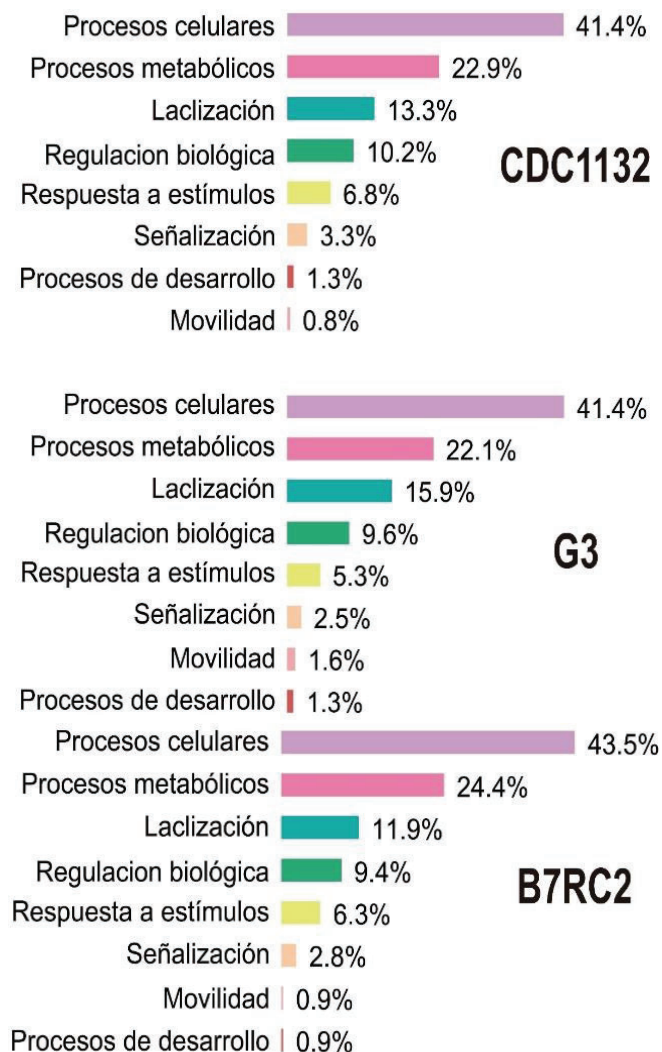
**Figura 2.16. Las VEs de las distintas cepas se diferencian en su contenido proteico.** (a) Gráfico de componentes principales para representar la similitud de las VEs de las cepas G3, B7RC2 y CDC1132 en lo que respecta a la carga proteica. Los datos se obtuvieron a partir del análisis de un proteoma cuantitativo de las VEs aisladas de las diferentes cepas. (b) Diagrama de Venn representando las proteínas compartidas entre las VEs aisladas de las distintas cepas.

Mediante un dendograma se realizó un agrupamiento jerárquico de las proteínas utilizando la correlación de Pearson como métrica de distancia; lo que demostró que las proteínas contenidas en las VEs eran distintas entre sí (Figura 2.17).



**Figura 2.17. Las VEs de las distintas cepas se diferencian en su contenido proteico.** Datos obtenidos en un Mapa de calor, donde cada línea representa una proteína. El gradiente en el color representa los cambios en la abundancia de la proteína.

A pesar de las diferencias observadas en el número de proteínas identificadas en las VEs de cada una de las cepas, un análisis de Gene Ontology (GO) demuestra que los procesos biológicos asociados a las proteínas contenidas en las VEs están altamente conservados. En resumen, los resultados obtenidos indican que las VEs aisladas de las tres cepas analizadas contienen proteínas asociadas a procesos celulares y metabólicos, respuesta a estímulos, señalización, procesos de desarrollo y locomoción, en porcentajes similares respecto al total de proteínas identificadas en cada una de las muestras analizadas (Figura 2.18).

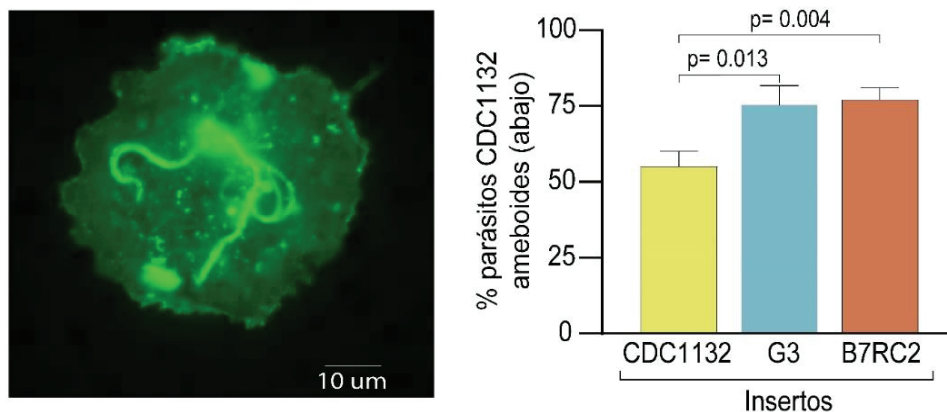


**Figura 2.18. Las proteínas encontradas en las VEs aisladas de las diferentes cepas están involucradas en los mismos procesos biológicos.** Las proteínas identificadas en las VEs se clasificaron en distintos grupos según los procesos biológico en los que participan mediante un análisis de Gene Ontology.

En conjunto, la diversidad de proteínas detectadas en los proteomas de las VEs analizadas sugiere que el contenido de proteínas liberadas por las VEs es específico de cepa.

### 2.5.6. La comunicación entre parásitos de diferentes cepas aumenta la adherencia a las células hospedadoras

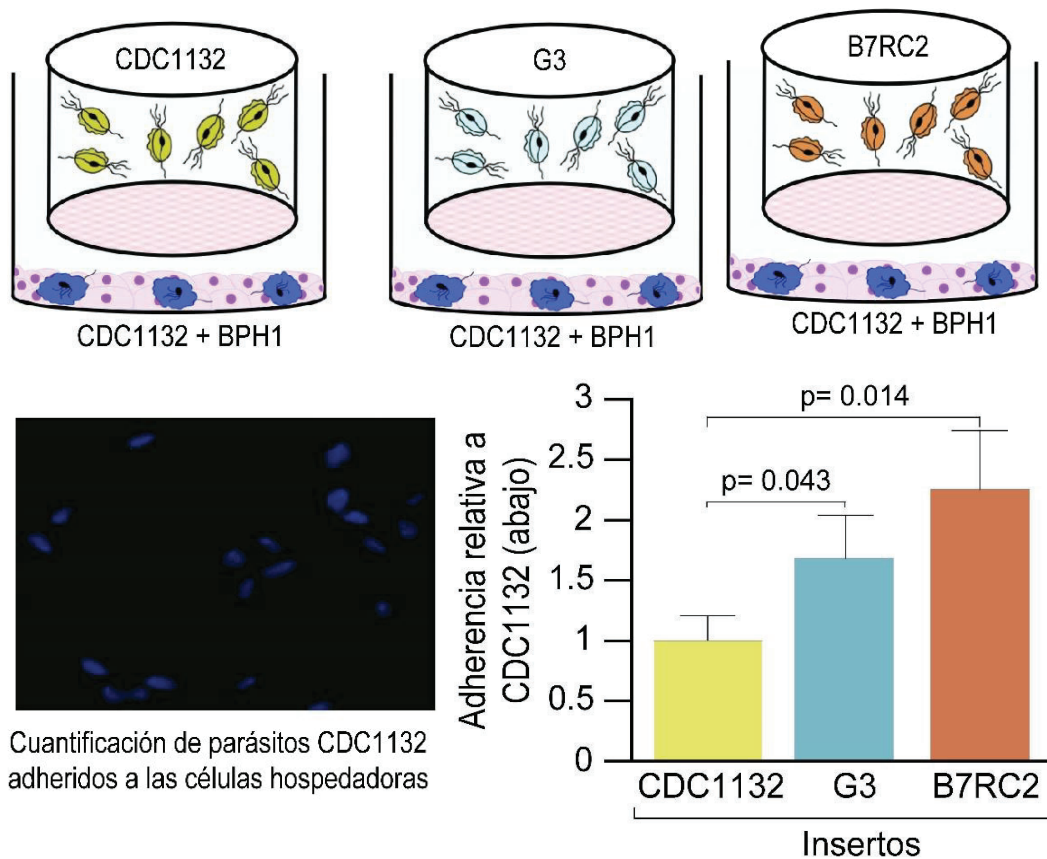
*T. vaginalis* es un parásito extracelular que durante el proceso de adherencia, el parásito cambia rápidamente de forma, transformándose en una forma ameboide, proceso que involucra una reorganización del citoesqueleto y mediante el cual maximiza su superficie de contacto con la célula hospedadora (Arroyo et al., 1993; Kusdian et al., 2013). Considerando la importancia de la transformación a un estadio ameboideo para adherirse a las células hospedadoras, evaluamos si la comunicación entre las diferentes cepas de *T. vaginalis* induce la transformación de parásitos de la cepa CDC1132 a este estadio. Se realizaron ensayos de co-incubación utilizando sistema de transwell similar al descrito en los ensayos previos para evaluar la cantidad de parásitos de la cepa CDC1132 en estado ameboideo cuando los mismos fueron incubados en presencia de las cepas G3 y B7RC2 (Figura 2.19). Como puede observarse en la Figura 2.19, en presencia de las cepas G3 o B7RC2 se produjo un aumento significativo en la cantidad de parásitos ameboides de la cepa CDC1132.



**Figura 2.19. Los parásitos CDC1132 se vuelven más ameboides en presencia de otras cepas.** Utilizando el sistema de insertos celulares se evaluó la transformación a la forma ameboide de parásitos de la cepa CDC1132 (abajo) en presencia de parásitos de las cepas CDC1132 (control), G3 y B7RC2 (insertos) Luego de la incubación, los parásitos adheridos a los cubreobjetos se tiñeron con WGA y se cuantificó el porcentaje de parásitos con forma ameboide. Los datos se expresan como porcentaje de parásitos ameboides  $\pm$  desvío

estándar (DE). Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Teniendo en cuenta la importancia de la transición al estado ameboideo en el proceso de adherencia a las células del hospedador, posteriormente se evaluamos si este aumento en la transformación ameboidea se traducía en un aumento en la adherencia de los parásitos CDC1132 a las células de próstata BPH1. Para este análisis utilizamos un diseño experimental con un sistema de transwell similar a los descriptos, pero incluyendo una monocapa de células prostáticas BPH1 en el fondo del pocillo (ver esquema Figura 2.20). Los resultados demostraron que la adherencia de los parásitos CDC1132 a las células BPH1 fue significativamente mayor cuando éstos eran co-incubados con las cepas G3 o B7RC2 en los insertos, en comparación con el control co-incubado con la misma cantidad de parásitos de la cepa CDC1132 en el inserto (Figura 2.20).

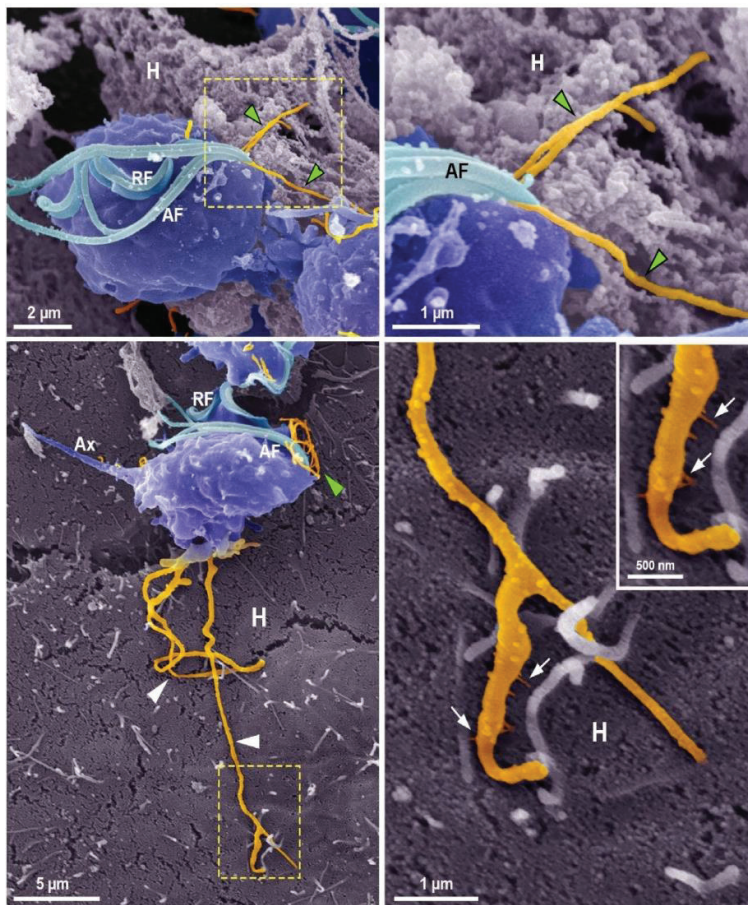


**Figura 2.20. La adherencia de los parásitos CDC1132 aumenta en presencia de otras cepas.** Parásitos de la cepa CDC1132 marcados con CellTracker Blue (azul) fueron



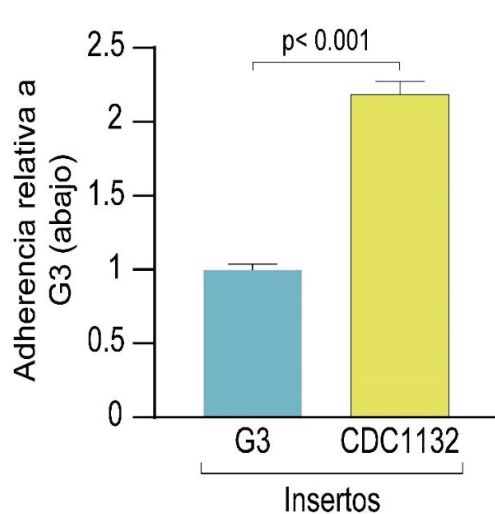
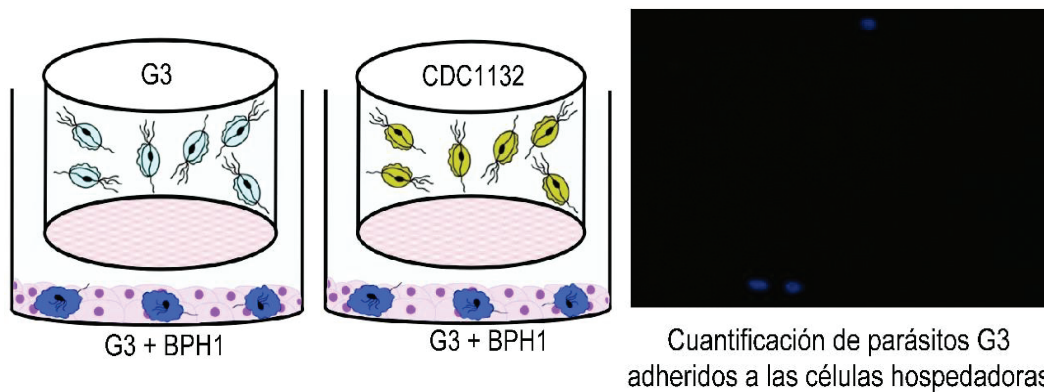
expuestos a una monocapa de células de próstata durante 30 min a 37 °C, en presencia de parásitos de las cepas CDC1132 (control), G3 y B7RC2 en los insertos. Luego de la incubación, se eliminaron los parásitos no adheridos, y se cuantificaron los parásitos adheridos a las células prostáticas mediante microscopía de fluorescencia. Los datos se expresan como un aumento de veces relativo al control  $\pm$  desvío estándar (DE). Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Estos hallazgos sugieren que la comunicación entre diferentes cepas de *T. vaginalis* puede afectar el comportamiento de los parásitos receptores, modulando de esta manera su adherencia a células del hospedador. En concordancia con estos resultados, y sugiriendo que los citonemas podrían tener un rol en el proceso de adherencia cuando los parásitos de la cepa CDC1132 son expuestos a células prostáticas, pudimos constatar mediante microscopía electrónica la presencia de citonemas protruyendo tanto de la base flagelar como del cuerpo celular de los parásitos que estaban en contacto con las células hospedadoras BPH1. Pudimos observar además extensiones delgadas que se ramificaban desde un citonema estableciendo un contacto estrecho con las células BPH1 (Figura 2.21).



**Figura 2.21. Los parásitos interactúan con las células de próstata a través de los citonemas.** Análisis de microscopía electrónica de barrido demuestra parásitos de la cepa CDC1132 (azules) interactuando con células hospedadoras (violetas) por medio de citonemas (anaranjados) que protruyen desde los flagelos (puntas de flechas verdes) y desde del cuerpo celular de los parásitos (flechas blancas). En las fotos del panel inferior, además se puede ver como los citonemas están ramificados (flechas blancas) e interactúan con las células BPH1. AF: flagelos anteriores; RF: flagelo recurrente; Ax: axostilo; H: célula hospedadora.

Teniendo en cuenta estos resultados, nos surgió el interrogante si la comunicación entre cepas podría afectar el comportamiento de una cepa habitualmente poco adherente (cepa G3). Para evaluar esto, utilizamos un diseño experimental similar al previamente descrito en la Figura 2.20, pero en este caso la cepa G3 (poco adherente) fue inoculada en el fondo del pocillo y la cepa CDC1132 (altamente adherente) en el inserto. Como se muestra en la Figura 2.22, la co-incubación de la cepa G3 con los parásitos CDC1132 resultó en un aumento de dos veces en la adherencia de G3 a las células BPH1 con respecto al control (parásitos de la cepa G3 co-incubados con parásitos de la cepa G3 en el inserto).



**Figura 2.22. Parásitos de la cepa G3 (poco adherente) aumentan su adherencia en presencia de parásitos de la cepa CDC1132 (adherente).** Parásitos de la cepa G3 marcados con CellTracker Blue (azul) fueron expuestos a una monocapa de células BPH1 (abajo); y co-incubados en los insertos con parásitos de la cepa G3 (control) o CDC1132 durante 30 min a 37 °C. Luego, se cuantificó la adherencia de los parásitos G3 a las células BPH1 utilizando el microscopio de fluorescencia. Los datos se expresan como un aumento de veces relativo al control  $\pm$  desvío estándar (DE). Se utilizó t-test student ( $\alpha = 0,95$ ) para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos.

Estos hallazgos estarían indicando que una cepa con alta capacidad de adherencia podría estar afectando el comportamiento de una cepa pobremente adherente, modificando su capacidad de adherencia a las células del

hospedador. En concordancia, un estudio realizado previamente demostró que la incubación de parásitos poco adherentes con VEs aisladas de cepas adherentes aumentaba su capacidad de adherencia a células hospedadoras (Twu et al., 2013). En conjunto, estos resultados proponen que la interacción entre cepas con características fenotípicas diferentes podría tener implicancias clínicas significativas durante las infecciones mixtas.

## Discusión

Las vesículas extracelulares desempeñan un papel clave en la comunicación entre *Trichomonas vaginalis* y las células hospedadoras. Sin embargo, su relación con la comunicación entre parásitos no ha sido aún analizada en detalle. En este contexto, un estudio previo mostró que la preincubación de sVEs aisladas de cepas altamente adherentes aumentó la unión de una cepa de baja adherencia a las células hospedadoras (Twu et al., 2013). Estos resultados sugieren que las sVEs podrían estar involucradas tanto en la comunicación entre parásitos, como en la comunicación entre el parásito y su hospedador. Acorde a esto, los resultados obtenidos en este capítulo de tesis demuestran que las VEs son responsables, al menos en parte, de la comunicación entre diferentes cepas del parásito. Específicamente, nuestros resultados demuestran que la incubación de muestras enriquecidas con VEs de las cepas G3 o B7RC2 tiene un efecto en la formación de filopodios y citonemas de parásitos de la cepa CDC1132.

Para una mayor comprensión de las vías moleculares involucradas en la respuesta diferencial durante la formación de citonemas y filopodios inducida por las VEs; analizamos el contenido proteico de las VEs secretadas por diferentes cepas de *T. vaginalis* mediante espectrometría de masas. Sorprendentemente, el número de proteínas detectadas en el proteoma de las VEs de la cepa B7RC2 fue consistentemente menor que el número de proteínas detectadas en G3 o CDC1132. En concordancia con esto, estudios previos de proteomas de sVEs y MVs realizados en la cepa B7RC2 identificaron 215 y 592 proteínas, respectivamente (Nievas et al., 2018; Twu et al., 2013). Sin embargo, cuando se analizó el proteoma de sVEs de la cepa TV79-49c1, se detectaron 1633 proteínas en estas muestras (Rada et al., 2022). Estos datos (Nievas et al., 2018; Rada et al., 2022; Twu et al., 2013), junto con los nuestros sugieren que las VEs liberadas por diferentes cepas de *T. vaginalis* son claramente diferentes y pueden contener proteínas específicas de cada cepa. La marcada diferencia en el número e identidad de las proteínas identificadas en los distintos proteomas de las VEs sugiere que la regulación del contenido proteico es específico de cepa. Sin embargo, a pesar de la variación en las proteínas liberadas en las VEs, observamos que los procesos biológicos identificados mediante análisis de GO

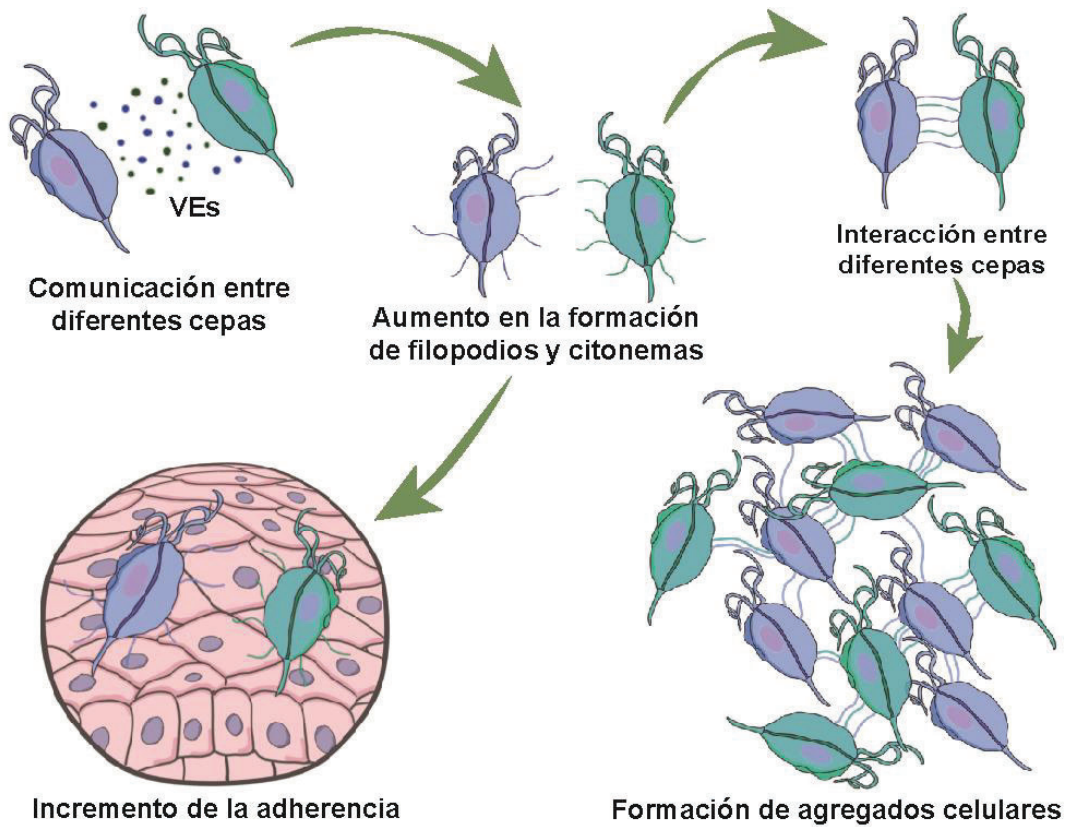
a partir del proteoma de las VEs aisladas de las distintas cepas fueron altamente conservados. Esta diversidad en la carga proteica podría explicar la respuesta diferencial observada cuando se incuban diferentes VEs con parásitos CDC1132. De manera interesante, hemos detectado varias proteínas diferenciales asociadas a procesos de señalización en el proteoma de las VEs, como por ejemplo proteínas de la familia Rho, en particular la Rho GTPasa, que en otros tipos celulares ha sido descrita como un mediador clave en la formación de filopodios y citonemas (Koizumi et al., 2012; Pellegrin & Mellor, 2005). Específicamente, miembros de esta familia fueron identificadas en las VEs aislados de las cepas G3 y CDC1132 (TVAG\_490150 y TVAG\_482020), pero no en las VEs de la cepa B7RC2. Además, identificamos una proteína de la familia Ras (TVAG\_580280) en las VEs liberadas por las tres cepas. Estudios previos han descrito a esta familia de proteínas como participantes claves también en la formación de filopodios en células eucariotas (Kozma et al., 1995). La proteína Calreticulina (TVAG\_464010), involucrada en el control de la adherencia celular y en la iniciación, estabilización y recambio de los contactos focales en fibroblastos (Opas et al., 1996; Villagomez et al., 2009) también fue detectada en los proteomas de las VEs de las tres cepas. Otras proteínas destacables son cuatro miembros de la familia de proteínas Profilina (TVAG\_159160, TVAG\_100620, TVAG\_492250 y TVAG\_208990), las cuales se han detectado en los aislamientos de VEs de las tres cepas y se ha demostrado que su regulación es crucial para la formación de filopodios en distintos tipos celulares, entre ellos en fibroblastos (Rotty et al., 2015; Skrubber et al., 2020). Dada la importancia de estas familias de proteínas en la formación de filopodios y citonemas en otros tipos celulares, sería interesante realizar un estudio funcional detallado a futuro. Es importante destacar que también pudimos identificar a la proteína VPS32, la cual hemos demostrado que regula la biogénesis de las VEs. También encontramos proteínas de transporte de membrana como las Clatrininas (Lafer, 2002; Wenzel et al., 2018) y proteínas de fusión de vesículas como las SNAREs (Wesolowski & Paumet, 2010). Por último, identificamos en las VEs liberadas por las tres cepas, proteínas cisteína peptidasa tipo L similar a la catepsina y una metalopeptidasa similar a la oligopeptidasa A. En este sentido, se sabe que el parásito libera diferentes

cisteína proteasas y metaloproteasas que son importantes para la patogénesis (Arroyo & Alderete, 1989; Ma et al., 2011).

Nuestros resultados demuestran que la comunicación entre parásitos de distintas cepas involucra las VEs liberadas por parásitos donantes, las cuales inducen la formación de citonemas y filopodios en las células receptoras (Figura 2.23). Las protrusiones celulares son extensiones de la membrana plasmática de las células individuales que funcionan como sensores especializados del entorno que permiten establecer uniones con la matriz extracelular y otras células (Adams, 2004). Específicamente, los filopodios vehiculizan moléculas de señalización a las células vecinas (Roy et al., 2014; Sanders et al., 2013), aumentan la adherencia (Albuschies & Vogel, 2013; Fierro-González et al., 2013) y actúan como organelas sensoriales (Wood & Martin, 2002). Los citonemas son considerados filopodios especializados que intercambian proteínas de señalización entre células (Casas-Tintó & Portela, 2019). Investigaciones recientes realizadas en células de mamíferos postularon a los filopodios y citonemas como una nueva forma de comunicación intercelular (Mattes & Scholpp, 2018). Nuestros resultados demuestran que las cepas de *T. vaginalis* más adherentes poseen mayor cantidad de filopodios y citonemas que protruyen de su superficie. Además, los resultados de microscopía electrónica sugieren que los citonemas podrían estar asociados a la formación de agregados formados por parásitos, observados habitualmente en las cepas adherentes. En este sentido, los tripanosomas africanos en la corriente sanguínea también producen protrusiones membranosas que se originan en la membrana flagelar y se conectan con los extremos posteriores de otros tripanosomas (Szempruch, Sykes, et al., 2016). En este trabajo, los autores también demostraron que estas interacciones eran estables a largas distancias (>20  $\mu\text{m}$ ) (Szempruch, Sykes, et al., 2016). En una investigación realizada en la mosca de la fruta observaron que los citonemas que se forman en las células del disco imaginal alar liberan VEs que transportan la proteína Hedgehog, la cual desempeña un papel crucial en la comunicación y señalización celular durante la formación de órganos y tejidos (Gradilla et al., 2014); demostrando la importancia de las VEs y los citonemas en la comunicación entre células distantes (Gradilla et al., 2014). Los citonemas podrían no solo ser una fuente de liberación de VEs, sino también una

guía para la entrega de dichas vesículas. Acorde con lo previamente detallado, nuestros resultados indican que la formación de citonemas en *T. vaginalis* se ve afectada por la presencia de vesículas extracelulares de una cepa diferente del parásito. Además, la comunicación entre parásitos de diferentes cepas afecta su adherencia a las células hospedadoras, probablemente debido al aumento de la formación de filopodios y citonemas. Teniendo en cuenta que se ha informado que en el 11% de los casos, las infecciones causadas por *T. vaginalis* son debido a la presencia de más de una cepa (Conrad et al., 2012); nuestros resultados exponiendo que las distintas cepas son capaces de comunicarse y afectar el fenotipo de la otra, podría tener importantes implicancias clínicas. Concretamente, nuestros resultados demuestran que una cepa poco adherente (G3) se adhiere más a las células prostáticas en presencia de una cepa altamente adherente (CDC1132), lo que indica que la interacción entre parásitos con fenotipos distintos podría afectar su comportamiento, influyendo potencialmente en el resultado de la infección. Aunque la relevancia de la comunicación parásito-parásito en *T. vaginalis* no ha sido profundamente explorada, estos resultados sugieren que podría tener un impacto significativo. En este contexto, existe una creciente evidencia empírica obtenida de pacientes y modelos animales que demuestra que las infecciones causadas por múltiples cepas en diferentes patógenos humanos pueden alterar la dinámica, el curso de la enfermedad y la transmisión (Balmer & Tanner, 2011). Hasta ahora, se ha demostrado de manera inequívoca la presencia de infecciones con múltiples cepas en 51 patógenos humanos (y 21 patógenos no humanos), y es probable que se presenten en la mayoría de las especies de patógenos, lo que indica que las infecciones por múltiples cepas son probablemente la norma y no la excepción (Balmer & Tanner, 2011).

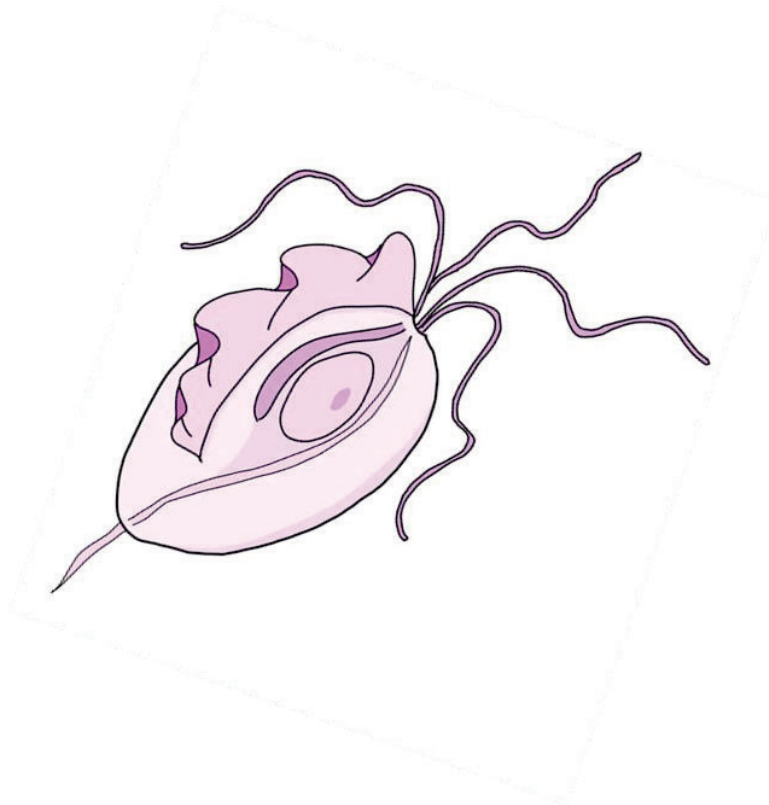
El estudio de la señalización, la detección y la comunicación celular entre parásitos protozoos contribuye a la comprensión de las interacciones patógeno-hospedador y de la dinámica de las enfermedades; proporcionando una base para futuros estudios sobre posibles enfoques alternativos de control.



**Figura 2.23. Rol de las VEs y los citonemas en la comunicación entre parásitos de diferentes cepas de *T. vaginalis*.** Los parásitos liberan VEs que contienen proteínas específicas de cepa y afectan la formación de filopodios y citonemas de los parásitos que internalizan dichas VEs. La comunicación entre cepas afecta la adherencia a las células hospedadoras, como resultado del aumento en los filopodios y los citonemas y también la formación de agregados celulares.



# CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES



El interés general de este trabajo de tesis consistió en el análisis de la biogénesis de las vesículas extracelulares y la interacción parásito-parásito en *Trichomonas vaginalis*. En los siguientes párrafos se exponen las conclusiones más relevantes obtenidas a lo largo de los dos capítulos, así como también, algunas consideraciones adicionales.

En el **capítulo I** demostramos que la proteína VPS32 está involucrada en la biogénesis de las vesículas extracelulares liberadas por el parásito. La proteína VPS32 (o Snf7 en otros organismos) es una proteína perteneciente al complejo ESCRTIII (Babst et al., 2002) y ya se ha demostrado que se encuentra involucrada en la selección de la carga contenida dentro de las vesículas extracelulares liberadas por otros organismos (Babst et al., 2002). Además, se ha encontrado que participa en la remodelación de las membranas (Murk et al., 2003); específicamente en *Tritrichomonas foetus* se ha indicado que es una proteína clave en la escisión de la membrana durante la citocinesis del parásito (Iriarte et al., 2018), lo cual nos lleva a hipotetizar que la proteína también sería un efector clave en la escisión de la membrana durante la liberación de vesículas extracelulares en *Trichomonas vaginalis*. Mediante microscopía electrónica de barrido e inmunoelectromicroscopía (colaboración con el Dr. Antonio Pereira-Neves, Fundação Oswaldo Cruz) demostramos que la proteína VPS32 se encuentra localizada en vesículas extracelulares y en organelas relacionadas a la liberación de este tipo de vesículas.

Demostramos que parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32 liberan mayores cantidades de vesículas extracelulares que los parásitos control, afectando tanto la producción de exosomas como de MVs. Por medio de espectrometría de masas demostramos también que la proteína VPS32 afecta la selección de la carga proteica dentro de las VEs. Este resultado era esperable, aunque no menos importante, ya que como hemos mencionado antes, el complejo ESCRT-III se encuentra involucrado en la clasificación de la carga dentro de las VEs. Por último, hemos demostrado que las VEs liberadas por los parásitos que sobreexpresan la proteína VPS32 se internalizan más que las liberadas por los parásitos control. Demostramos también que estas VEs favorecen la adherencia del parásito a las células de próstata, requisito fundamental para el proceso de infección de *Trichomonas vaginalis*. Estos

resultados sientan las bases para futuros estudios sobre la relevancia de esta proteína en el proceso de adherencia del parásito a las células hospedadoras.

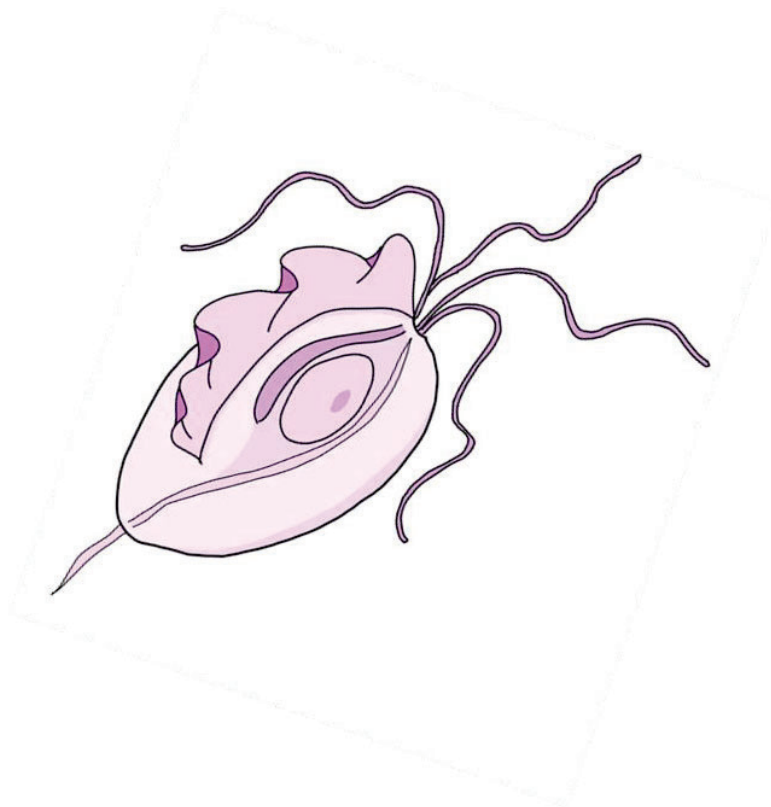
En el **capítulo II** evidenciamos, mediante microscopía electrónica de barrido, la existencia de estructuras tipo citonemas, las cuales se sabe que en otros organismos tienen funciones relacionadas a la comunicación celular y a la adherencia (Casas-Tintó & Portela, 2019; Kornberg & Roy, 2014b; Mattes & Scholpp, 2018; Roy et al., 2014); siendo los parásitos de cepas adherentes los que formaban mayor cantidad de estas estructuras. También observamos citonemas entre parásitos dentro de los “*clumps*”, los cuales son agregados que forman los parásitos de cepas adherentes (Coceres et al., 2015), indicando que este tipo de conexiones podría estar permitiendo que los parásitos se mantengan unidos.

Demostramos además que los “*clumps*” pueden estar formados por más de una cepa del parásito. Realizando ensayos de co-incubación entre diferentes cepas demostramos que parásitos que son altamente adherentes como CDC1132, forman mayor cantidad de filopodios y citonemas en presencia de otras cepas (G3 y B7RC2); lo que da indicios de que existe la comunicación entre estos parásitos. Demostramos que las VEs podían mediar, al menos en parte, esa comunicación y que esto podría ser debido a un contenido proteico específico dentro de las VEs liberadas por las distintas cepas. Por último, utilizando ensayos de adherencia a células de próstata con placas transwell, comprobamos que la comunicación entre cepas afecta la adherencia de los parásitos; lo que revela que la comunicación entre cepas en una posible infección mixta podría tener implicancias clínicas relevantes. Estos resultados plantean la necesidad de futuros estudios, sobre todo teniendo en cuenta que las infecciones mixtas podrían producir no sólo que cepas poco adherentes modifiquen su adherencia a las células hospedadoras, sino que también a través de vesículas extracelulares podrían intercambiar información génica vinculada a la resistencia a diferentes drogas, como ya se ha observado en otros organismos (Douanne et al., 2022).

En resumen, aunque ambos capítulos de la tesis estudian mecanismos independientes, creemos que los resultados obtenidos aportan al conocimiento

general acerca de distintos aspectos que favorecen el proceso de patogénesis del parásito *Trichomonas vaginalis*.

# ANEXOS

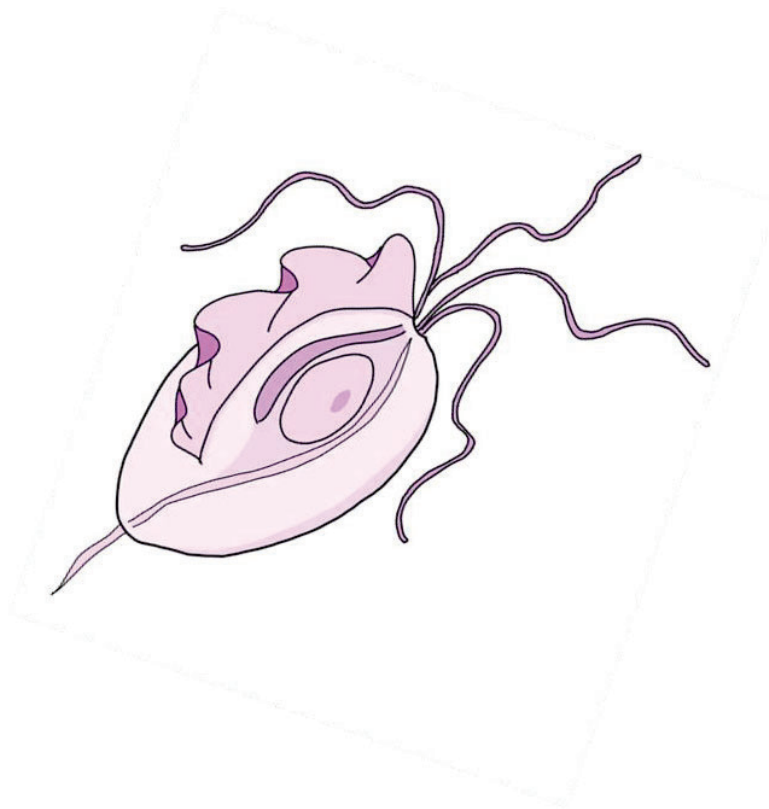


**Tabla suplementaria 1: “Proteoma de VEs de *Trichomonas vaginalis*”.**

**Tabla suplementaria 2: “Proteoma de VEs de diferentes cepas de *Trichomonas vaginalis*”.**

Debido a la extensión de estas tablas, las mismas se adjuntaron al archivo PDF de la tesis como libros de Excel.

# BIBLIOGRAFÍA



- Abels, E. R., & Breakefield, X. O. (2016). Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(3), 301-312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
- Abhyankar, M. M., Shrimal, S., Gilchrist, C. A., Bhattacharya, A., & Petri, W. A. (2012). The Entamoeba histolytica serum-inducible transmembrane kinase EhTMKB1-9 is involved in intestinal amebiasis. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance*, 2, 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.002>
- Abou Karam, P., Rosenhek-Goldian, I., Ziv, T., Ben Ami Pilo, H., Azuri, I., Rivkin, A., Kiper, E., Rotkopf, R., Cohen, S. R., Torrecilhas, A. C., Avinoam, O., Rojas, A., Morandi, M. I., & Regev-Rudzki, N. (2022). Malaria parasites release vesicle subpopulations with signatures of different destinations. *EMBO Reports*, 23(7), e54755. <https://doi.org/10.15252/embr.202254755>
- Adam, R. D. (2001). Biology of Giardia lamblia. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447-475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Adams, J. C. (2004). Fascin Protrusions in Cell Interactions. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(6), 221-226. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2004.06.002>
- Adell, M. A. Y., Vogel, G. F., Pakdel, M., Müller, M., Lindner, H., Hess, M. W., & Teis, D. (2014). Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. *The Journal of Cell Biology*, 205(1), 33-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310114>
- Albuschies, J., & Vogel, V. (2013). The role of filopodia in the recognition of nanotopographies. *Scientific Reports*, 3, 1658. <https://doi.org/10.1038/srep01658>
- Alderete, J. F., Newton, E., Dennis, C., & Neale, K. A. (1991). The vagina of women infected with Trichomonas vaginalis has numerous proteinases and antibody to trichomonad proteinases. *Genitourinary Medicine*, 67(6), 469-474. <https://doi.org/10.1136/sti.67.6.469>



- Allsworth, J. E., Ratner, J. A., & Peipert, J. F. (2009). Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: Results from the 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sexually Transmitted Diseases*, 36(12), 738-744.  
<https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3181b38a4b>
- Alonso Y Adell, M., Migliano, S. M., & Teis, D. (2016). ESCRT-III and Vps4: A dynamic multipurpose tool for membrane budding and scission. *The FEBS Journal*, 283(18), 3288-3302. <https://doi.org/10.1111/febs.13688>
- Amos, B., Aurrecochea, C., Barba, M., Barreto, A., Basenko, E. Y., Bazant, W., Belnap, R., Blevins, A. S., Böhme, U., Brestelli, J., Brunk, B. P., Caddick, M., Callan, D., Campbell, L., Christensen, M. B., Christophides, G. K., Crouch, K., Davis, K., DeBarry, J., ... Zheng, J. (2022). VEuPathDB: The eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D898-D911.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab929>
- Andersson, J. O., Hirt, R. P., Foster, P. G., & Roger, A. J. (2006). Evolution of four gene families with patchy phylogenetic distributions: Influx of genes into protist genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-27>
- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., Novellino, L., Clementi, E., Giussani, P., Viani, P., Matteoli, M., & Verderio, C. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *The EMBO Journal*, 31(5), 1231-1240.  
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.489>
- Arjonen, A., Kaukonen, R., & Ivaska, J. (2011). Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adhesion & Migration*, 5(5), 421-430. <https://doi.org/10.4161/cam.5.5.17723>
- Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O., & Lewis, N. E. (2021). Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00292-x>

- Arroyo, R., & Alderete, J. F. (1989). Trichomonas vaginalis surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity*, 57(10), 2991-2997. <https://doi.org/10.1128/iai.57.10.2991-2997.1989>
- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., & Alderete, J. F. (1993). Signalling of Trichomonas vaginalis for amoeboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. *Molecular Microbiology*, 7(2), 299-309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01121.x>
- Artuyants, A., Campos, T. L., Rai, A. K., Johnson, P. J., Dauros-Singorenko, P., Phillips, A., & Simoes-Barbosa, A. (2020). Extracellular vesicles produced by the protozoan parasite Trichomonas vaginalis contain a preferential cargo of tRNA-derived small RNAs. *International Journal for Parasitology*, 50(14), 1145-1155. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.07.003>
- Atayde, V. D., Aslan, H., Townsend, S., Hassani, K., Kamhawi, S., & Olivier, M. (2015). Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan Leishmania within the Sand Fly Midgut. *Cell Reports*, 13(5), 957-967. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.058>
- Attias, M., Teixeira, D. E., Benchimol, M., Vommaro, R. C., Crepaldi, P. H., & De Souza, W. (2020). The life-cycle of Toxoplasma gondii reviewed using animations. *Parasites & Vectors*, 13(1), 588. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-z>
- Atyame Nten, C. M., Sommerer, N., Rofidal, V., Hirtz, C., Rossignol, M., Cuny, G., Peltier, J.-B., & Geiger, A. (2010). Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 212817. <https://doi.org/10.1155/2010/212817>
- Aurrecochea, C., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carlton, J. M., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J. A., Morrison, H. G., ... Wang, H. (2009). GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist

- pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl\_1), D526-D530. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn631>
- Avalos-Padilla, Y., Georgiev, V. N., Lantero, E., Pujals, S., Verhoef, R., N Borgheti-Cardoso, L., Albertazzi, L., Dimova, R., & Fernández-Busquets, X. (2021). The ESCRT-III machinery participates in the production of extracellular vesicles and protein export during *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens*, 17(4), e1009455. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009455>
- Avalos-Padilla, Y., Knorr, R. L., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Lipowsky, R., Dimova, R., & Orozco, E. (2018). The Conserved ESCRT-III Machinery Participates in the Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 53. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00053>
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., & Emr, S. D. (2002). Escrt-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental Cell*, 3(2), 271-282. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00220-4](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00220-4)
- Balmer, O., & Tanner, M. (2011). Prevalence and implications of multiple-strain infections. *The Lancet. Infectious Diseases*, 11(11), 868-878. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70241-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70241-9)
- Bañuelos, C., García-Rivera, G., López-Reyes, I., Mendoza, L., González-Robles, A., Herranz, S., Vincent, O., & Orozco, E. (2012). EhADH112 Is a Bro1 Domain-Containing Protein Involved in the *Entamoeba histolytica* Multivesicular Bodies Pathway. *BioMed Research International*, 2012, e657942. <https://doi.org/10.1155/2012/657942>
- Barratt, J. L. N., Cao, M., Stark, D. J., & Ellis, J. T. (2015). The Transcriptome Sequence of *Dientamoeba fragilis* Offers New Biological Insights on its Metabolism, Kinome, Degradome and Potential Mechanisms of Pathogenicity. *Protist*, 166(4), 389-408. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2015.06.002>

- Bastida-Corcuera, F. D., Okumura, C. Y., Colocoussi, A., & Johnson, P. J. (2005). *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot Cell*, *4*(11), 1951-1958.  
<https://doi.org/10.1128/ec.4.11.1951-1958.2005>
- Baumgärtel, V., Ivanchenko, S., Dupont, A., Sergeev, M., Wiseman, P. W., Kräusslich, H.-G., Bräuchle, C., Müller, B., & Lamb, D. C. (2011). Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nature Cell Biology*, *13*(4), 469-474. <https://doi.org/10.1038/ncb2215>
- Ben Ami Pilo, H., Khan Khilji, S., Lühle, J., Biskup, K., Levy Gal, B., Rosenhek Goldian, I., Alfandari, D., Revach, O.-Y., Kiper, E., Morandi, M. I., Rotkopf, R., Porat, Z., Blanchard, V., Seeberger, P. H., Regev-Rudzki, N., & Moscovitz, O. (2022). Sialylated N-glycans mediate monocyte uptake of extracellular vesicles secreted from *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Journal of Extracellular Biology*, *1*(2), e33.  
<https://doi.org/10.1002/jex2.33>
- Benchimol, M., Miranda-Magalhães, A., Pereira-Neves, A., & Souza, W. (2021a). *Tritrichomonas foetus*: New structures by high-resolution scanning helium ion microscopy. *BIOCELL*, *45*(2), Article 2. <https://doi.org/10.32604/biocell.2021.014599>
- Benchimol, M., Miranda-Magalhães, A., Pereira-Neves, A., & Souza, W. (2021b). *Tritrichomonas foetus*: New structures by high-resolution scanning helium ion microscopy. *BIOCELL*, *45*(2), Article 2. <https://doi.org/10.32604/biocell.2021.014599>
- Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E. H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M., & Verderio, C. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *The EMBO Journal*, *28*(8), 1043-1054. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.45>

- Bich, L., Pradeu, T., & Moreau, J.-F. (2019). Understanding Multicellularity: The Functional Organization of the Intercellular Space. *Frontiers in Physiology*, *10*, 1170.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01170>
- Bissig, C., & Gruenberg, J. (2014). ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends in Cell Biology*, *24*(1), 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.10.009>
- Blackman, M. J. (2008). Malarial proteases and host cell egress: An «emerging» cascade. *Cellular Microbiology*, *10*(10), 1925-1934. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01176.x>
- Bobrie, A., & Théry, C. (2013). Exosomes and communication between tumours and the immune system: Are all exosomes equal? *Biochemical Society Transactions*, *41*(1), 263-267. <https://doi.org/10.1042/BST20120245>
- Bonfim-Melo, A., Ferreira, E. R., Florentino, P. T. V., & Mortara, R. A. (2018). Amastigote Synapse: The Tricks of Trypanosoma cruzi Extracellular Amastigotes. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01341>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, *116*(2), 153-166. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)
- Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(12), 786-801.  
<https://doi.org/10.1038/nrm3904>
- Borgheti-Cardoso, L. N., Kooijmans, S. A. A., Chamorro, L. G., Biosca, A., Lantero, E., Ramírez, M., Avalos-Padilla, Y., Crespo, I., Fernández, I., Fernandez-Becerra, C., Del Portillo, H. A., & Fernández-Busquets, X. (2020). Extracellular vesicles derived from Plasmodium-infected and non-infected red blood cells as targeted drug delivery vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, *587*, 119627.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119627>

- Bosch, D. E., & Siderovski, D. P. (2013). G protein signaling in the parasite *Entamoeba histolytica*. *Experimental & Molecular Medicine*, *45*(3), Article 3.  
<https://doi.org/10.1038/emm.2013.30>
- Bosch, D. E., & Siderovski, D. P. (2015). *Entamoeba histolytica* RacC Selectively Engages p21-Activated Kinase Effectors. *Biochemistry*, *54*(2), 404-412.  
<https://doi.org/10.1021/bi501226f>
- Boselli, F., Chiossi, G., Bortolamasi, M., & Gallinelli, A. (2005). Prevalence and determinants of genital shedding of herpes simplex virus among women attending Italian colposcopy clinics. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, *118*(1), 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.05.017>
- Boxma, B., de Graaf, R. M., van der Staay, G. W. M., van Alen, T. A., Ricard, G., Gabaldón, T., van Hoek, A. H. A. M., Moon-van der Staay, S. Y., Koopman, W. J. H., van Hellemond, J. J., Tielens, A. G. M., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M. A., & Hackstein, J. H. P. (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*, *434*(7029), Article 7029. <https://doi.org/10.1038/nature03343>
- Bradic, M., Warring, S. D., Low, V., & Carlton, J. M. (2014). The Tc1/mariner transposable element family shapes genetic variation and gene expression in the protist *Trichomonas vaginalis*. *Mobile DNA*, *5*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-5-12>
- Brennan, K., Martin, K., FitzGerald, S. P., O'Sullivan, J., Wu, Y., Blanco, A., Richardson, C., & McGee, M. M. (2020). A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57497-7>
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., & van Deurs, B. (2000). Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, *11*(2), 467-480.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.2.467>

- Buschow, S. I., Nolte-'t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *10*(10), 1528-1542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>
- Caeiro, L. D., Alba-Soto, C. D., Rizzi, M., Solana, M. E., Rodriguez, G., Chidichimo, A. M., Rodriguez, M. E., Sánchez, D. O., Levy, G. V., & Tekiel, V. (2018). The protein family TcTASV-C is a novel Trypanosoma cruzi virulence factor secreted in extracellular vesicles by trypomastigotes and highly expressed in bloodstream forms. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *12*(5), e0006475. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006475>
- Camacho, A. C., Alfandari, D., Kozela, E., & Regev-Rudzki, N. (2023). Biogenesis of extracellular vesicles in protozoan parasites: The ESCRT complex in the trafficking fast lane? *PLOS Pathogens*, *19*(2), e1011140. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011140>
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C. M., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., ... Johnson, P. J. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5809), 207-212. <https://doi.org/10.1126/science.1132894>
- Caruso, S., & Poon, I. K. H. (2018). Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1486-1486. PubMed. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01486>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. (2001). Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. *The Journal of Infectious Diseases*, *184*(3), 337-344. <https://doi.org/10.1086/322044>

- Casas-Tintó, S., & Portela, M. (2019). Cytonemes, Their Formation, Regulation, and Roles in Signaling and Communication in Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijms20225641>
- Cashikar, A. G., Shim, S., Roth, R., Maldazys, M. R., Heuser, J. E., & Hanson, P. I. (2014). Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding. *ELife*, 3. Scopus. <https://doi.org/10.7554/eLife.02184>
- Castelli, G., Bruno, F., Saieva, L., Alessandro, R., Galluzzi, L., Diotallevi, A., & Vitale, F. (2019). Exosome secretion by *Leishmania infantum* modulate the chemotactic behavior and cytokinic expression creating an environment permissive for early infection. *Experimental Parasitology*, 198, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.01.014>
- Cavallaro, U., & Dejana, E. (2011). Adhesion molecule signalling: Not always a sticky business. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(3), 189-197. <https://doi.org/10.1038/nrm3068>
- Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., & Caplan, M. J. (2010). Exosome release of  $\beta$ -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology*, 190(6), 1079-1091. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>
- Charrin, S., Jouannet, S., Boucheix, C., & Rubinstein, E. (2014). Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 17), 3641-3648. <https://doi.org/10.1242/jcs.154906>
- Chen, Y. P., Riestra, A. M., Rai, A. K., & Johnson, P. J. (2019). A Novel Cadherin-like Protein Mediates Adherence to and Killing of Host Cells by the Parasite *Trichomonas vaginalis*. *MBio*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00720-19>
- Cherpes, T. L., Wiesenfeld, H. C., Melan, M. A., Kant, J. A., Cosentino, L. A., Meyn, L. A., & Hillier, S. L. (2006). The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sexually Transmitted Diseases*, 33(12), 747-752. <https://doi.org/10.1097/01.olq.0000218869.52753.c7>



- Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (2008). Lysobisphosphatidic Acid Controls Endosomal Cholesterol Levels\*. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(41), 27871-27880.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801463200>
- Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., Colom, A., Humbert, F., Lenz, M., Scheuring, S., & Roux, A. (2015). Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell*, *163*(4), 866-879. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.017>
- Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes. *Proteomics*, *13*(10-11), 1554-1571.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.201200329>
- Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K., & Gho, Y. S. (2015). Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev*, *34*(4), 474-490.  
<https://doi.org/10.1002/mas.21420>
- Christy, N. C. V., & Petri, W. A. (2011). Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiology*, *6*(12), 1501-1519. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.120>
- Clague, M. J., Liu, H., & Urbé, S. (2012). Governance of Endocytic Trafficking and Signaling by Reversible Ubiquitylation. *Developmental Cell*, *23*(3), 457-467.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.08.011>
- Clark, C. G., & Diamond, L. S. (2002). Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin Microbiol Rev*, *15*(3), 329-341.  
<https://doi.org/10.1128/cmr.15.3.329-341.2002>
- Coceres, V. M., Alonso, A. M., Nievas, Y. R., Midlej, V., Frontera, L., Benchimol, M., Johnson, P. J., & de Miguel, N. (2015). The C-terminal tail of tetraspanin proteins regulates their intracellular distribution in the parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol*, *17*(8), 1217-1229. <https://doi.org/10.1111/cmi.12431>

- Coceres, V. M., Iriarte, L. S., Miranda-Magalhães, A., Santos de Andrade, T. A., de Miguel, N., & Pereira-Neves, A. (2021). Ultrastructural and Functional Analysis of a Novel Extra-Axonemal Structure in Parasitic Trichomonads. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.757185>
- Cociorva, D., L. Tabb, D., & Yates, J. R. (2006). Validation of Tandem Mass Spectrometry Database Search Results Using DTASelect. *Current Protocols in Bioinformatics*, *16*(1), 13.4.1-13.4.14. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1304s16>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol*, *25*(6), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
- Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: Artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, *19*(2), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>
- Colineau, L., Clos, J., Moon, K.-M., Foster, L. J., & Reiner, N. E. (2017). Leishmania donovani chaperonin 10 regulates parasite internalization and intracellular survival in human macrophages. *Medical Microbiology and Immunology*, *206*(3), 235-257. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0500-7>
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Thery, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*, *126*(Pt 24), 5553-5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Conrad, M. D., Bradic, M., Warring, S. D., Gorman, A. W., & Carlton, J. M. (2013). Getting trichy: Tools and approaches to interrogating Trichomonas vaginalis in a post-genome world. *Trends in Parasitology*, *29*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.10.004>
- Conrad, M. D., Gorman, A. W., Schillinger, J. A., Fiori, P. L., Arroyo, R., Malla, N., Dubey, M. L., Gonzalez, J., Blank, S., Secor, W. E., & Carlton, J. M. (2012). Extensive Genetic Diversity, Unique Population Structure and Evidence of Genetic Exchange in the Sexually

- Transmitted Parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1573. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001573>
- Costa, R. F. M. da, Souza, W. de, Benchimol, M., Alderete, J. F., & Morgado-Díaz, J. A. (2005). *Trichomonas vaginalis* perturbs the junctional complex in epithelial cells. *Cell Research*, 15(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290340>
- Cotch, M. F., Pastorek, J. G., Nugent, R. P., Hillier, S. L., Gibbs, R. S., Martin, D. H., Eschenbach, D. A., Edelman, R., Carey, J. C., Regan, J. A., Krohn, M. A., Klebanoff, M. A., Rao, A. V., Rhoads, G. G., & Group, T. V. I. A. P. S. (1997). *Trichomonas vaginalis* Associated With Low Birth Weight and Preterm Delivery. *Sexually Transmitted Diseases*, 24(6), 353-360.
- Cowman, A. F., Berry, D., & Baum, J. (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *Journal of Cell Biology*, 198(6), 961-971. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206112>
- Cronemberger-Andrade, A., Xander, P., Soares, R. P., Pessoa, N. L., Campos, M. A., Ellis, C. C., Grajeda, B., Ofir-Birin, Y., Almeida, I. C., Regev-Rudzki, N., & Torrecilhas, A. C. (2020). *Trypanosoma cruzi*-Infected Human Macrophages Shed Proinflammatory Extracellular Vesicles That Enhance Host-Cell Invasion via Toll-Like Receptor 2. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00099>
- Cudmore, S. L., Delgaty, K. L., Hayward-McClelland, S. F., Petrin, D. P., & Garber, G. E. (2004). Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 783-793. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.783-793.2004>
- Cuervo, P., Cupolillo, E., Britto, C., González, L. J., E Silva-Filho, F. C., Lopes, L. C., Domont, G. B., & De Jesus, J. B. (2008). Differential soluble protein expression between *Trichomonas vaginalis* isolates exhibiting low and high virulence phenotypes. *Journal of Proteomics*, 71(1), 109-122. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.01.010>

- Dantas-Pereira, L., Menna-Barreto, R., & Lannes-Vieira, J. (2021). Extracellular Vesicles: Potential Role in Remote Signaling and Inflammation in *Trypanosoma cruzi*-Triggered Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 798054. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.798054>
- de Miguel, N., Lustig, G., Twu, O., Chattopadhyay, A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2010). Proteome analysis of the surface of *Trichomonas vaginalis* reveals novel proteins and strain-dependent differential expression. *Mol Cell Proteomics*, *9*(7), 1554-1566. <https://doi.org/10.1074/mcp.M000022-MCP201>
- de Miguel, N., Riestra, A., & Johnson, P. J. (2012). Reversible association of tetraspanin with *Trichomonas vaginalis* flagella upon adherence to host cells. *Cellular Microbiology*, *14*(12), 1797-1807. <https://doi.org/10.1111/cmi.12003>
- De Pablos, L. M., Díaz Lozano, I. M., Jercic, M. I., Quinzada, M., Giménez, M. J., Calabuig, E., Espino, A. M., Schijman, A. G., Zulantay, I., Apt, W., & Osuna, A. (2016). The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. *Scientific Reports*, *6*, 27293. <https://doi.org/10.1038/srep27293>
- de Pablos Torró, L. M., Retana Moreira, L., & Osuna, A. (2018). Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1190. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01190>
- Debs, S., Cohen, A., Hosseini-Beheshti, E., Chimini, G., Hunt, N. H., & Grau, G. E. R. (2019). Interplay of extracellular vesicles and other players in cerebral malaria pathogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, *1863*(2), 325-331. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.10.012>
- Dekel, E., Yaffe, D., Rosenhek-Goldian, I., Ben-Nissan, G., Ofir-Birin, Y., Morandi, M. I., Ziv, T., Sisquella, X., Pimentel, M. A., Nebl, T., Kapp, E., Ohana Daniel, Y., Karam, P. A., Alfandari, D., Rotkopf, R., Malihi, S., Temin, T. B., Mullick, D., Revach, O.-Y., ... Regev-Rudzki, N. (2021). 20S proteasomes secreted by the malaria parasite promote its

growth. *Nature Communications*, 12(1), 1172. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21344-8>

Delgado, M. G., Liston, D. R., Niazi, K., & Johnson, P. J. (1997). Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9), 4716-4720. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.9.4716>

Dhahbi, J. M. (2015). 5' tRNA Halves: The Next Generation of Immune Signaling Molecules. *Frontiers in Immunology*, 6, 74. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00074>

Díaz Lozano, I. M., De Pablos, L. M., Longhi, S. A., Zago, M. P., Schijman, A. G., & Osuna, A. (2017). Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Scientific Reports*, 7, 44451. <https://doi.org/10.1038/srep44451>

Dong, G., Filho, A. L., & Olivier, M. (2019). Modulation of Host-Pathogen Communication by Extracellular Vesicles (EVs) of the Protozoan Parasite *Leishmania*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 100. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00100>

Douanne, N., Dong, G., Amin, A., Bernardo, L., Blanchette, M., Langlais, D., Olivier, M., & Fernandez-Prada, C. (2022). *Leishmania* parasites exchange drug-resistance genes through extracellular vesicles. *Cell Reports*, 40(3), 111121. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111121>

Dozio, V., Lejon, V., Mumba Ngoyi, D., Büscher, P., Sanchez, J.-C., & Tiberti, N. (2019). Cerebrospinal Fluid-Derived Microvesicles From Sleeping Sickness Patients Alter Protein Expression in Human Astrocytes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 391. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00391>

Edman, U., Meraz, M. A., Rausser, S., Agabian, N., & Meza, I. (1990). Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Experimental Medicine*, 172(3), 879-888. <https://doi.org/10.1084/jem.172.3.879>

- Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., & Lippincott-Schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(12), 4846-4851.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1102714108>
- Elias, J. E., & Gygi, S. P. (2007). Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods*, *4*(3), 207-214.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth1019>
- Eliaz, D., Kannan, S., Shaked, H., Arvatz, G., Tkacz, I. D., Binder, L., Waldman Ben-Asher, H., Okalang, U., Chikne, V., Cohen-Chalamish, S., & Michaeli, S. (2017). Exosome secretion affects social motility in *Trypanosoma brucei*. *PLOS Pathogens*, *13*(3), e1006245.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006245>
- Evans-Osses, I., Mojoli, A., Monguió-Tortajada, M., Marcilla, A., Aran, V., Amorim, M., Inal, J., Borràs, F. E., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released from *Giardia intestinalis* disturb host-pathogen response in vitro. *European Journal of Cell Biology*, *96*(2), 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.005>
- Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J. D., Briggs, J. A., Weissenhorn, W., & Kozlov, M. M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol*, *5*(11), e1000575. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000575>
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J. C., & Gould, S. J. (2007). Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol*, *5*(6), e158-e158. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050158>
- Fichorova, R. N. (2009). Impact of *T. vaginalis* infection on innate immune responses and reproductive outcome. *Journal of Reproductive Immunology*, *83*(1-2), 185-189.  
<https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.08.007>

- Fichorova, R. N., Yamamoto, H. S., Fashemi, T., Foley, E., Ryan, S., Beatty, N., Dawood, H., Hayes, G. R., St-Pierre, G., Sato, S., & Singh, B. N. (2016). Trichomonas vaginalis Lipophosphoglycan Exploits Binding to Galectin-1 and -3 to Modulate Epithelial Immunity. *J Biol Chem*, *291*(2), 998-1013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.651497>
- Fierro-González, J. C., White, M. D., Silva, J. C., & Plachta, N. (2013). Cadherin-dependent filopodia control preimplantation embryo compaction. *Nature Cell Biology*, *15*(12), 1424-1433. <https://doi.org/10.1038/ncb2875>
- Fink, M. Y., & Singer, S. M. (2017). The Intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. *Trends in Parasitology*, *33*(11), 901-913. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.08.001>
- Fióri, P. L., Rappelli, P., Addis, M. F., Mannu, F., & Cappuccinelli, P. (1997). Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by Trichomonas vaginalis. *Infection and Immunity*, *65*(12), 5142-5148. <https://doi.org/10.1128/iai.65.12.5142-5148.1997>
- Florens, L., Carozza, M. J., Swanson, S. K., Fournier, M., Coleman, M. K., Workman, J. L., & Washburn, M. P. (2006). Analyzing chromatin remodeling complexes using shotgun proteomics and normalized spectral abundance factors. *Methods (San Diego, Calif.)*, *40*(4), 303-311. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.028>
- Forrest, D. M., Batista, M., Marchini, F. K., Tempone, A. J., & Traub-Csekö, Y. M. (2020). Proteomic analysis of exosomes derived from procyclic and metacyclic-like cultured Leishmania infantum chagasi. *Journal of Proteomics*, *227*, 103902. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103902>
- Fritz-Laylin, L. K., Assaf, Z. J., Chen, S., & Cande, W. Z. (2010). Naegleria gruberi De Novo Basal Body Assembly Occurs via Stepwise Incorporation of Conserved Proteins. *Eukaryotic Cell*, *9*(6), 860-865. <https://doi.org/10.1128/EC.00381-09>

- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., & Orozco, E. (2022). EhVps23, an ESCRT-I Member, Is a Key Factor in Secretion, Motility, Phagocytosis and Tissue Invasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 835654. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.835654>
- Galindo, A., Javier-Reyna, R., García-Rivera, G., Bañuelos, C., Montañón, S., Ortega-Lopez, J., Chávez-Munguía, B., Salazar-Villatoro, L., & Orozco, E. (2021). EhVps23: A Component of ESCRT-I That Participates in Vesicular Trafficking and Phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 770759. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.770759>
- Gallop, J. L. (2020). Filopodia and their links with membrane traffic and cell adhesion. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *102*, 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.11.017>
- Garcia-Silva, M. R., das Neves, R. F. C., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., Naya, H., Fernandez-Calero, T., Souto-Padron, T., de Souza, W., & Cayota, A. (2014). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, *113*(1), 285-304. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3655-1>
- Gavinho, B., Sabatke, B., Feijoli, V., Rossi, I. V., da Silva, J. M., Evans-Osses, I., Palmisano, G., Lange, S., & Ramirez, M. I. (2020). Peptidylarginine Deiminase Inhibition Abolishes the Production of Large Extracellular Vesicles From *Giardia intestinalis*, Affecting Host-Pathogen Interactions by Hindering Adhesion to Host Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 417. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00417>
- Geiger, A., Hirtz, C., Bécue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., Rossignol, M., Cuny, G., & Peltier, J.-B. (2010). Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiology*, *10*, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-20>



- Gerdes, H.-H., & Carvalho, R. N. (2008). Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(4), 470-475.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.005>
- Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J. M., Pobbati, A. V., Veprintsev, D. B., Crowther, R. A., Emr, S. D., Egelman, E. H., & Williams, R. L. (2008). Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure (London, England: 1993)*, 16(9), 1345-1356. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.06.010>
- Ghosh, J., Bose, M., Roy, S., & Bhattacharyya, S. N. (2013). Leishmania donovani targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell Host & Microbe*, 13(3), 277-288.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.005>
- Gimenes, F., Souza, R. P., Bento, J. C., Teixeira, J. J. V., Maria-Engler, S. S., Bonini, M. G., & Consolaro, M. E. L. (2014). Male infertility: A public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nature Reviews. Urology*, 11(12), 672-687.  
<https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.285>
- Ginger, M. L. (2006). Niche metabolism in parasitic protozoa. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1465), 101-118.  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1756>
- Ginger, M. L., Fritz-Laylin, L. K., Fulton, C., Cande, W. Z., & Dawson, S. C. (2010). Intermediary Metabolism in Protists: A Sequence-based View of Facultative Anaerobic Metabolism in Evolutionarily Diverse Eukaryotes. *Protist*, 161(5), 642-671.  
<https://doi.org/10.1016/j.protis.2010.09.001>
- Gioseffi, A., Edelmann, M. J., & Kima, P. E. (2021). Intravacuolar Pathogens Hijack Host Extracellular Vesicle Biogenesis to Secrete Virulence Factors. *Frontiers in Immunology*, 12, 662944. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662944>

- Gioseffi, A., Hamerly, T., Van, K., Zhang, N., Dinglasan, R. R., Yates, P. A., & Kima, P. E. (2020). Leishmania-infected macrophages release extracellular vesicles that can promote lesion development. *Life Science Alliance*, 3(12), e202000742. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000742>
- Glading, A., Lauffenburger, D. A., & Wells, A. (2002). Cutting to the chase: Calpain proteases in cell motility. *Trends in Cell Biology*, 12(1), 46-54. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02179-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02179-1)
- Gottlieb, S. L., Douglas, J. M., Foster, M., Schmid, D. S., Newman, D. R., Baron, A. E., Bolan, G., Iatesta, M., Malotte, C. K., Zenilman, J., Fishbein, M., Peterman, T. A., Kamb, M. L., & Project RESPECT Study Group. (2004). Incidence of herpes simplex virus type 2 infection in 5 sexually transmitted disease (STD) clinics and the effect of HIV/STD risk-reduction counseling. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(6), 1059-1067. <https://doi.org/10.1086/423323>
- Gould, S. B., Woehle, C., Kusdian, G., Landan, G., Tachezy, J., Zimorski, V., & Martin, W. F. (2013). Deep sequencing of *Trichomonas vaginalis* during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *International Journal for Parasitology*, 43(9), 707-719. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.002>
- Gould, S. J., & Raposo, G. (2013). As we wait: Coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>
- Govender, Y., Chan, T., Yamamoto, H. S., Budnik, B., & Fichorova, R. N. (2020). The Role of Small Extracellular Vesicles in Viral-Protozoan Symbiosis: Lessons From *Trichomonasvirus* in an Isogenic Host Parasite Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.591172>
- Gradilla, A.-C., González, E., Seijo, I., Andrés, G., Bischoff, M., González-Mendez, L., Sánchez, V., Callejo, A., Ibáñez, C., Guerra, M., Ortigão-Farias, J. R., Sutherland, J. D., González, M.,

- Barrio, R., Falcón-Pérez, J. M., & Guerrero, I. (2014). Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nature Communications*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms6649>
- Gramma, D. F., Casarotti, L. da S., Morato, M. G. V. de A., Silva, L. S., Mendonça, D. F., Limongi, J. E., Viana, J. da C., & Cury, M. C. (2013). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and risk factors in women treated at public health units in Brazil: A transversal study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(9), 584-591. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt063>
- Guenther, P. C., Secor, W. E., & Dezzutti, C. S. (2005). *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: Implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infection and Immunity*, 73(7), 4155-4160. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4155-4160.2005>
- Gulati, S., Ekland, E. H., Ruggles, K. V., Chan, R. B., Jayabalasingham, B., Zhou, B., Mantel, P.-Y., Lee, M. C. S., Spottiswoode, N., Coburn-Flynn, O., Hjelmqvist, D., Worgall, T. S., Marti, M., Di Paolo, G., & Fidock, D. A. (2015). Profiling the Essential Nature of Lipid Metabolism in Asexual Blood and Gametocyte Stages of *Plasmodium falciparum*. *Cell Host & Microbe*, 18(3), 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.08.003>
- Handrich, M. R., Garg, S. G., Sommerville, E. W., Hirt, R. P., & Gould, S. B. (2019). Characterization of the BspA and Pmp protein family of trichomonads. *Parasites & Vectors*, 12(1), 406. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3660-z>
- Hassani, K., & Olivier, M. (2013). Immunomodulatory impact of leishmania-induced macrophage exosomes: A comparative proteomic and functional analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2185. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002185>

- Hassani, K., Shio, M. T., Martel, C., Faubert, D., & Olivier, M. (2014). Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes. *PloS One*, 9(4), e95007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095007>
- Helms, D. J., Mosure, D. J., Secor, W. E., & Workowski, K. A. (2008). Management of trichomonas vaginalis in women with suspected metronidazole hypersensitivity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(4), 370.e1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.10.795>
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell*, 21(1), 77-91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., Zhao, Y., & Emr, S. D. (2012). The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell*, 151(2), 356-371. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.039>
- Hernández, H. M., Marcet, R., & Sarracent, J. (2014). Biological roles of cysteine proteinases in the pathogenesis of Trichomonas vaginalis. *Parasite*, 21, 54. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014054>
- Hirt, R. P., de Miguel, N., Nakjang, S., Dessi, D., Liu, Y.-C., Diaz, N., Rappelli, P., Acosta-Serrano, A., Fiori, P.-L., & Mottram, J. C. (2011). Trichomonas vaginalis pathobiology new insights from the genome sequence. *Advances in Parasitology*, 77, 87-140. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391429-3.00006-X>
- Hirt, R. P., Noel, C. J., Sicheritz-Ponten, T., Tachezy, J., & Fiori, P.-L. (2007). Trichomonas vaginalis surface proteins: A view from the genome. *Trends in Parasitology*, 23(11), 540-547. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.08.020>
- Hirt, R. P., & Sherrard, J. (2015). Trichomonas vaginalis origins, molecular pathobiology and clinical considerations. *Curr Opin Infect Dis*, 28(1), 72-79. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000128>

- Honigberg, B. M. (1990). Host Cell-Trichomonad Interactions and Virulence Assays Using in Vitro Systems. En B. M. Honigberg (Ed.), *Trichomonads Parasitic in Humans* (pp. 155-212). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3224-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3224-7_9)
- Honigberg, B. M., & King, V. M. (1964). STRUCTURE OF TRICHOMONAS VAGINALIS DONN'E. *The Journal of Parasitology*, *50*, 345-364.
- Hoots, B. E., Peterman, T. A., Torrone, E. A., Weinstock, H., Meites, E., & Bolan, G. A. (2013). A Trich-y question: Should Trichomonas vaginalis infection be reportable? *Sexually Transmitted Diseases*, *40*(2), 113-116. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e31827c08c3>
- Horváthová, L., Šafaríková, L., Basler, M., Hrdy, I., Campo, N. B., Shin, J.-W., Huang, K.-Y., Huang, P.-J., Lin, R., Tang, P., & Tachezy, J. (2012). Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated Trichomonas vaginalis genome. *Genome Biology and Evolution*, *4*(10), 1017-1029. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs078>
- Huang, K.-Y., Huang, P.-J., Ku, F.-M., Lin, R., Alderete, J. F., & Tang, P. (2012). Comparative transcriptomic and proteomic analyses of Trichomonas vaginalis following adherence to fibronectin. *Infection and Immunity*, *80*(11), 3900-3911. <https://doi.org/10.1128/IAI.00611-12>
- Hurley, J. H., & Odorizzi, G. (2012). Get on the exosome bus with ALIX. *Nature Cell Biology*, *14*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/ncb2530>
- Inagaki Satoru, Onishi Shinsuke, Kuramitsu Howard K., & Sharma Ashu. (2006). Porphyromonas gingivalis Vesicles Enhance Attachment, and the Leucine-Rich Repeat BspA Protein Is Required for Invasion of Epithelial Cells by "Tannerella forsythia". *Infection and Immunity*, *74*(9), 5023-5028. <https://doi.org/10.1128/IAI.00062-06>
- Iriarte, L. S., Midlej, V., Frontera, L. S., Moros Duarte, D., Barbeito, C. G., de Souza, W., Benchimol, M., de Miguel, N., & Coceres, V. M. (2018). TfVPS32 Regulates Cell Division

in the Parasite *Trichomonas foetus*. *J Eukaryot Microbiol*, 65(1), 28-37.

<https://doi.org/10.1111/jeu.12424>

Jacquemet, G., Hamidi, H., & Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Current Opinion in Cell Biology*, 36, 23-31.

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.06.007>

Jesus, J. B., Vannier-Santos, M. A., Britto, C., Godefroy, P., Silva-Filho, F. C., Pinheiro, A. A. S., Rocha-Azevedo, B., Lopes, A. H. C. S., & Meyer-Fernandes, J. R. (2004). *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: The comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitology Research*, 93(5), 369-377. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1134-4>

Jiang, M., Strand, D. W., Fernandez, S., He, Y., Yi, Y., Birbach, A., Qiu, Q., Schmid, J., Tang, D. G., & Hayward, S. W. (2010). Functional Remodeling of Benign Human Prostatic Tissues In Vivo by Spontaneously Immortalized Progenitor and Intermediate Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(2), 344-356. <https://doi.org/10.1002/stem.284>

Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P. D., & Simon, S. M. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nature Cell Biology*, 13(4), 394-401.

<https://doi.org/10.1038/ncb2207>

Kaiser, P., & Wohlschlegel, J. (2005). Identification of Ubiquitination Sites and Determination of Ubiquitin-Chain Architectures by Mass Spectrometry. In *Methods in Enzymology* (Vol. 399, pp. 266-277). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)99018-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)99018-6)

Keam, S. P., & Hutvagner, G. (2015). tRNA-Derived Fragments (tRFs): Emerging New Roles for an Ancient RNA in the Regulation of Gene Expression. *Life (Basel, Switzerland)*, 5(4), 1638-1651. <https://doi.org/10.3390/life5041638>

Kelstrup, C. D., Young, C., Lavalley, R., Nielsen, M. L., & Olsen, J. V. (2012). Optimized Fast and Sensitive Acquisition Methods for Shotgun Proteomics on a Quadrupole Orbitrap Mass

- Spectrometer. *Journal of Proteome Research*, 11(6), 3487-3497.  
<https://doi.org/10.1021/pr3000249>
- Kissinger, P., & Adamski, A. (2013). Trichomoniasis and HIV interactions: A review. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 426-433. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-051005>
- Klemba, M., & Goldberg, D. E. (2002). Biological Roles of Proteases in Parasitic Protozoa. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 275-305.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.145453>
- Klodnicki, M. E., McDougald, L. R., & Beckstead, R. B. (2013). A genomic analysis of *Histomonas meleagridis* through sequencing of a cDNA library. *The Journal of Parasitology*, 99(2), 264-269. <https://doi.org/10.1645/GE-3256.1>
- Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J.-M., Lebrand, C., Cosson, P., Kobayashi, T., & Gruenberg, J. (2002). Separation and Characterization of Late Endosomal Membrane Domains\*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32157-32164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202838200>
- Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biology*, 1(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.1038/10084>
- Koehler, A. V., Jex, A. R., Haydon, S. R., Stevens, M. A., & Gasser, R. B. (2014). Giardia/giardiasis—A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnology Advances*, 32(2), 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.009>
- Koizumi, K., Takano, K., Kaneyasu, A., Watanabe-Takano, H., Tokuda, E., Abe, T., Watanabe, N., Takenawa, T., & Endo, T. (2012). RhoD activated by fibroblast growth factor induces cytoneme-like cellular protrusions through mDia3C. *Molecular Biology of the Cell*, 23(23), 4647-4661. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-04-0315>

- Korenkova, O., Pepe, A., & Zurzolo, C. (2020). Fine intercellular connections in development: TNTs, cytonemes, or intercellular bridges? *Cell Stress*, 4(2), 30-43.  
<https://doi.org/10.15698/cst2020.02.212>
- Kornberg, T. B., & Roy, S. (2014a). Cytonemes as specialized signaling filopodia. *Development (Cambridge, England)*, 141(4), 729-736. <https://doi.org/10.1242/dev.086223>
- Kornberg, T. B., & Roy, S. (2014b). Cytonemes as specialized signaling filopodia. *Development*, 141(4), 729-736. <https://doi.org/10.1242/dev.086223>
- Kowal, J., Tkach, M., & Thery, C. (2014). Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol*, 29, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., & Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), 1942-1952.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.1942>
- Krutovskikh, V. A., Piccoli, C., & Yamasaki, H. (2002). Gap junction intercellular communication propagates cell death in cancerous cells. *Oncogene*, 21(13), 1989-1999.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205187>
- Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S. B., & Dutta, A. (2014). Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Biology*, 12(1), 78.  
<https://doi.org/10.1186/s12915-014-0078-0>
- Kummer, S., Hayes, G. R., Gilbert, R. O., Beach, D. H., Lucas, J. J., & Singh, B. N. (2008). Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microbial Pathogenesis*, 44(3), 197-203.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.09.004>



- Kusdian, G., & Gould, S. B. (2014). The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *198*(2), 92-99.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.01.004>
- Kusdian, G., Woehle, C., Martin, W. F., & Gould, S. B. (2013). The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cellular Microbiology*, *15*(10), 1707-1721.  
<https://doi.org/10.1111/cmi.12144>
- Lafer, E. M. (2002). Clathrin-protein interactions. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *3*(8), 513-520. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30801.x>
- Lal, K., Field, M. C., Carlton, J. M., Warwicker, J., & Hirt, R. P. (2005). Identification of a very large Rab GTPase family in the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *143*(2), 226-235.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.06.008>
- Lambertz, U., Oviedo Ovando, M. E., Vasconcelos, E. J. R., Unrau, P. J., Myler, P. J., & Reiner, N. E. (2015). Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world *Leishmania* providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging. *BMC Genomics*, *16*(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1260-7>
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Göttlinger, H. G., & Weissenhorn, W. (2008). Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science*, *321*(5894), 1354-1357. <https://doi.org/10.1126/science.1161070>
- Lazar, C., Gatto, L., Ferro, M., Bruley, C., & Burger, T. (2016). Accounting for the Multiple Natures of Missing Values in Label-Free Quantitative Proteomics Data Sets to Compare Imputation Strategies. *Journal of Proteome Research*, *15*(4), 1116-1125.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00981>

- Lazenby, G. B., Soper, D. E., & Nolte, F. S. (2013). Correlation of Leukorrhea and *Trichomonas vaginalis* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(7), 2323-2327.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.00416-13>
- Lehker, M. W., & Alderete, J. F. (2000). Biology of trichomonosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *13*(1), 37-45. <https://doi.org/10.1097/00001432-200002000-00007>
- Lehker, M. W., & Sweeney, D. (1999). Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sexually Transmitted Infections*, *75*(4), 231.  
<https://doi.org/10.1136/sti.75.4.231>
- Leitsch, D. (2016). Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field. *F1000Research*, *5*, F1000 Faculty Rev-162. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7594.1>
- Leitsch, D., Janssen, B. D., Kolarich, D., Johnson, P. J., & Duchêne, M. (2014). *Trichomonas vaginalis* flavin reductase 1 and its role in metronidazole resistance. *Molecular Microbiology*, *91*(1), 198-208. <https://doi.org/10.1111/mmi.12455>
- Lenz, M., Crow, D. J. G., & Joanny, J.-F. (2009). Membrane Buckling Induced by Curved Filaments. *Physical Review Letters*, *103*(3), 38101.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.103.038101>
- Leon, S. R., Konda, K. A., Bernstein, K. T., Pajuelo, J. B., Rosasco, A. M., Caceres, C. F., Coates, T. J., & Klausner, J. D. (2009). *Trichomonas vaginalis* Infection and Associated Risk Factors in a Socially-Marginalized Female Population in Coastal Peru. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, *2009*, 752437. <https://doi.org/10.1155/2009/752437>
- Leung, K. F., Dacks, J. B., & Field, M. C. (2008). Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *9*(10), 1698-1716. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00797.x>
- Leung, K. F., Riley, F. S., Carrington, M., & Field, M. C. (2011). Ubiquitylation and developmental regulation of invariant surface protein expression in trypanosomes. *Eukaryotic Cell*, *10*(7), 916-931. <https://doi.org/10.1128/EC.05012-11>

- Li, D.-L., Zou, W.-H., Deng, S.-Q., & Peng, H.-J. (2019). Analysis of the Differential Exosomal miRNAs of DC2.4 Dendritic Cells Induced by *Toxoplasma gondii* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(21), 5506. <https://doi.org/10.3390/ijms20215506>
- Li, Y., Liu, Y., Xiu, F., Wang, J., Cong, H., He, S., Shi, Y., Wang, X., Li, X., & Zhou, H. (2018). Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *International Journal of Nanomedicine*, *13*, 467-477. <https://doi.org/10.2147/IJN.S151110>
- Li, Y., Xiu, F., Mou, Z., Xue, Z., Du, H., Zhou, C., Li, Y., Shi, Y., He, S., & Zhou, H. (2018). Exosomes derived from *Toxoplasma gondii* stimulate an inflammatory response through JNK signaling pathway. *Nanomedicine (London, England)*, *13*(10), 1157-1168. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0035>
- Lopez, M. A., Nguyen, H. T., Oberholzer, M., & Hill, K. L. (2011). Social parasites. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(6), 642-648. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.09.012>
- Lorenzo-Benito, S., Rivera-Rivas, L. A., Sánchez-Ayala, L., Ortega-López, J., Montes-Flores, O., Talamás-Lara, D., & Arroyo, R. (2022). Omics Analyses of *Trichomonas vaginalis* Actin and Tubulin and Their Participation in Intercellular Interactions and Cytokinesis. *Genes*, *13*(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/genes13061067>
- Luppi, C. G., de Oliveira, R. L. S., Veras, M. A., Lippman, S. A., Jones, H., de Jesus, C. H., Pinho, A. A., Ribeiro, M. C., & Caiaffa-Filho, H. (2011). [Early diagnosis and correlations of sexually transmitted infections among women in primary care health services]. *Revista Brasileira De Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology*, *14*(3), 467-477. <https://doi.org/10.1590/s1415-790x2011000300011>
- Lustig, G., Ryan, C. M., Secor, W. E., & Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* contact-dependent cytolysis of epithelial cells. *Infect Immun*, *81*(5), 1411-1419. <https://doi.org/10.1128/iai.01244-12>

- Luzio, J. P., Gray, S. R., & Bright, N. A. (2010). Endosome-lysosome fusion. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1413-1416. <https://doi.org/10.1042/BST0381413>
- Luzio, J. P., Parkinson, M. D. J., Gray, S. R., & Bright, N. A. (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 5), 1019-1021. <https://doi.org/10.1042/BST0371019>
- Ma, L., Meng, Q., Cheng, W., Sung, Y., Tang, P., Hu, S., & Yu, J. (2011). Involvement of the GP63 protease in infection of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research*, 109(1), 71-79. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2222-2>
- Mann, J. R., McDermott, S., & Gill, T. (2010). Sexually transmitted infection is associated with increased risk of preterm birth in South Carolina women insured by Medicaid. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 23(6), 563-568. <https://doi.org/10.3109/14767050903214574>
- Mantel, P.-Y., Hjelmqvist, D., Walch, M., Kharoubi-Hess, S., Nilsson, S., Ravel, D., Ribeiro, M., Grüring, C., Ma, S., Padmanabhan, P., Trachtenberg, A., Ankarklev, J., Brancucci, N. M., Huttenhower, C., Duraisingh, M. T., Ghiran, I., Kuo, W. P., Filgueira, L., Martinelli, R., & Marti, M. (2016). Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nature Communications*, 7, 12727. <https://doi.org/10.1038/ncomms12727>
- Mantel, P.-Y., Hoang, A. N., Goldowitz, I., Potashnikova, D., Hamza, B., Vorobjev, I., Ghiran, I., Toner, M., Irimia, D., Ivanov, A. R., Barteneva, N., & Marti, M. (2013). Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host & Microbe*, 13(5), 521-534. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.009>

- Marion, S., & Guillén, N. (2006). Genomic and proteomic approaches highlight phagocytosis of living and apoptotic human cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *International Journal for Parasitology*, *36*(2), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.10.007>
- Matta, S. K., Rinkenberger, N., Dunay, I. R., & Sibley, L. D. (2021). *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. *Nature Reviews. Microbiology*, *19*(7), 467-480. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00518-7>
- Mattes, B., & Scholpp, S. (2018). Emerging role of contact-mediated cell communication in tissue development and diseases. *Histochemistry and Cell Biology*, *150*(5), 431-442. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1732-3>
- Mause, S. F., & Weber, C. (2010). Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation Research*, *107*(9), 1047-1057. Scopus. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226456>
- Mellor, H. (2010). The role of formins in filopodia formation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1803*(2), 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.12.018>
- Mi, H., Muruganujan, A., & Thomas, P. D. (2013). PANTHER in 2013: Modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D377-386. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1118>
- Midlej, V., de Souza, W., & Benchimol, M. (2019). The peripheral vesicles gather multivesicular bodies with different behavior during the *Giardia intestinalis* life cycle. *Journal of Structural Biology*, *207*(3), 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.07.002>
- Minkoff, H., Grunebaum, A. N., Schwarz, R. H., Feldman, J., Cummings, M., Crombleholme, W., Clark, L., Pringle, G., & McCormack, W. M. (1984). Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: A prospective study of the vaginal flora in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *150*(8), 965-972. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(84\)90392-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(84)90392-2)

- Mitteregger, D., Aberle, S. W., Makristathis, A., Walochnik, J., Brozek, W., Marberger, M., & Kramer, G. (2012). High detection rate of *Trichomonas vaginalis* in benign hyperplastic prostatic tissue. *Med Microbiol Immunol*, *201*(1), 113-116.  
<https://doi.org/10.1007/s00430-011-0205-2>
- Molgora, B. M., Rai, A. K., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Hess, S., & Johnson, P. J. (2021). A Novel *Trichomonas vaginalis* Surface Protein Modulates Parasite Attachment via Protein:Host Cell Proteoglycan Interaction. *MBio*, *12*(1).  
<https://doi.org/10.1128/mBio.03374-20>
- Momen-Heravi, F., Balaj, L., Alian, S., Mantel, P.-Y., Halleck, A. E., Trachtenberg, A. J., Soria, C. E., Oquin, S., Bonebreak, C. M., Saracoglu, E., Skog, J., & Kuo, W. P. (2013). Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biological Chemistry*, *394*(10), 1253-1262. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0141>
- Mony, B. M., MacGregor, P., Ivens, A., Rojas, F., Cowton, A., Young, J., Horn, D., & Matthews, K. (2014). Genome-wide dissection of the quorum sensing signalling pathway in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, *505*(7485), 681-685.  
<https://doi.org/10.1038/nature12864>
- Moodley, P., Connolly, C., & Sturm, A. W. (2002). Interrelationships among human immunodeficiency virus type 1 infection, bacterial vaginosis, trichomoniasis, and the presence of yeasts. *The Journal of Infectious Diseases*, *185*(1), 69-73.  
<https://doi.org/10.1086/338027>
- Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J.-M., & Toti, F. (2011). Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(1), 15-26. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200956>
- Morin-Adeline, V., Lomas, R., O'Meally, D., Stack, C., Conesa, A., & Šlapeta, J. (2014). Comparative transcriptomics reveals striking similarities between the bovine and feline

- isolates of *Tritrichomonas foetus*: Consequences for in silico drug-target identification. *BMC Genomics*, 15(1), 955. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-955>
- Morin-Adeline, V., Mueller, K., Conesa, A., & Šlapeta, J. (2015). Comparative RNA-seq analysis of the *Tritrichomonas foetus* PIG30/1 isolate from pigs reveals close association with *Tritrichomonas foetus* BP-4 isolate «bovine genotype». *Veterinary Parasitology*, 212(3-4), 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.012>
- Moyano, S., Musso, J., Feliziani, C., Zamponi, N., Frontera, L. S., Ropolo, A. S., Lanfredi-Rangel, A., Lalle, M., & Touz, M. (2019). Exosome Biogenesis in the Protozoa Parasite *Giardia lamblia*: A Model of Reduced Interorganellar Crosstalk. *Cells*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/cells8121600>
- Müller, M., Lossick, J. G., & Gorrell, T. E. (1988). In vitro Susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to Metronidazole and Treatment Outcome in Vaginal Trichomoniasis. *Sexually Transmitted Diseases*, 15(1), 17-24.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G. M., & Martin, W. F. (2012). Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 76(2), 444-495. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05024-11>
- Murk, J. L. A. N., Humbel, B. M., Ziese, U., Griffith, J. M., Posthuma, G., Slot, J. W., Koster, A. J., Verkleij, A. J., Geuze, H. J., & Kleijmeer, M. J. (2003). Endosomal compartmentalization in three dimensions: Implications for membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13332-13337. <https://doi.org/10.1073/pnas.2232379100>
- Musatovova, O., & Alderete, J. F. (1998). Molecular analysis of the gene encoding the immunodominant phenotypically varying P270 protein of *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis*, 24(4), 223-239. <https://doi.org/10.1006/mpat.1997.0199>

- Muzny, C. A., & Schwebke, J. R. (2013). The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. *Sex Transm Infect*, *89*(6), 423-425.  
<https://doi.org/10.1136/sextrans-2012-050893>
- Nabhan, J. F., Hu, R., Oh, R. S., Cohen, S. N., & Lu, Q. (2012). Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(11), 4146-4151.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1200448109>
- Neira O., P., Correa LL., A., Muñoz S., N., Tardío O., M. T., & Carabelli F., M. (2005). FRECUENCIA DE INFECCIÓN POR TRICHOMONAS VAGINALIS EN ATENCIÓN PRIMARIA DE SALUD. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, *70*(3), 147-151.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-75262005000300003>
- Neves, R. F. C., Fernandes, A. C. S., Meyer-Fernandes, J. R., & Souto-Padrón, T. (2014). Trypanosoma cruzi-secreted vesicles have acid and alkaline phosphatase activities capable of increasing parasite adhesion and infection. *Parasitology Research*, *113*(8), 2961-2972. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3958-x>
- Nielsen, M. H., & Nielsen, R. (1975). Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donné: Interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, *83*(4), 305-320.  
<https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1975.tb00107.x>
- Nievas, Y. R., Coceres, V. M., Midlej, V., de Souza, W., Benchimol, M., Pereira-Neves, A., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Johnson, P. J., & de Miguel, N. (2018). Membrane-shed vesicles from the parasite *Trichomonas vaginalis*: Characterization and their association with cell interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *75*(12), 2211-2226. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2726-3>



- Nievas, Y. R., Lizarraga, A., Salas, N., Cóceres, V. M., & de Miguel, N. (2020). Extracellular vesicles released by anaerobic protozoan parasites: Current situation. *Cellular Microbiology*, 22(11), e13257. <https://doi.org/10.1111/cmi.13257>
- Noël, C. J., Diaz, N., Sicheritz-Ponten, T., Safarikova, L., Tachezy, J., Tang, P., Fiori, P.-L., & Hirt, R. P. (2010). Trichomonas vaginalis vast BspA-like gene family: Evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics*, 11, 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-99>
- Nogueira, P. M., de Menezes-Neto, A., Borges, V. M., Descoteaux, A., Torrecilhas, A. C., Xander, P., Revach, O.-Y., Regev-Rudzki, N., & Soares, R. P. (2020). Immunomodulatory Properties of Leishmania Extracellular Vesicles During Host-Parasite Interaction: Differential Activation of TLRs and NF- $\kappa$ B Translocation by Dermotropic and Viscerotropic Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.00380>
- Nogueira, P. M., Ribeiro, K., Silveira, A. C. O., Campos, J. H., Martins-Filho, O. A., Bela, S. R., Campos, M. A., Pessoa, N. L., Colli, W., Alves, M. J. M., Soares, R. P., & Torrecilhas, A. C. (2015). Vesicles from different Trypanosoma cruzi strains trigger differential innate and chronic immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 28734. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.28734>
- Nussbaum, K., Honek, J., Cadmus, C. M. C. v C., & Efferth, T. (2010). Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 17(15), 1594-1617. <https://doi.org/10.2174/092986710790979953>
- Oberholzer, M., Lopez, M. A., McLelland, B. T., & Hill, K. L. (2010). Social Motility in African Trypanosomes. *PLOS Pathogens*, 6(1), e1000739. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000739>
- Odintsova, E., van Niel, G., Conjeaud, H., Raposo, G., Iwamoto, R., Mekada, E., & Berditchevski, F. (2013). Metastasis suppressor tetraspanin CD82/KAI1 regulates ubiquitylation of

- epidermal growth factor receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(36), 26323-26334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439380>
- Ofir-Birin, Y., Ben Ami Pilo, H., Cruz Camacho, A., Rudik, A., Rivkin, A., Revach, O.-Y., Nir, N., Block Tamin, T., Abou Karam, P., Kiper, E., Peleg, Y., Nevo, R., Solomon, A., Havkin-Solomon, T., Rojas, A., Rotkopf, R., Porat, Z., Avni, D., Schwartz, E., ... Regev-Rudzki, N. (2021). Malaria parasites both repress host CXCL10 and use it as a cue for growth acceleration. *Nature Communications*, 12(1), 4851. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24997-7>
- Ofir-Birin, Y., Heidenreich, M., & Regev-Rudzki, N. (2017). Pathogen-derived extracellular vesicles coordinate social behaviour and host manipulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.03.004>
- Okumura, C. Y., Baum, L. G., & Johnson, P. J. (2008). Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol*, 10(10), 2078-2090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01190.x>
- Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K., & Shio, M. T. (2012). Leishmania virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. *Special issue on virulence factors of parasites*, 14(15), 1377-1389. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>
- Olmos-Ortiz, L. M., Barajas-Mendiola, M. A., Barrios-Rodiles, M., Castellano, L. E., Arias-Negrete, S., Avila, E. E., & Cuéllar-Mata, P. (2017). *Trichomonas vaginalis* exosome-like vesicles modify the cytokine profile and reduce inflammation in parasite-infected mice. *Parasite Immunology*, 39(6). <https://doi.org/10.1111/pim.12426>
- Opas, M., Szewczenko-Pawlikowski, M., Jass, G. K., Mesaeli, N., & Michalak, M. (1996). Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *Journal of Cell Biology*, 135(6), 1913-1923. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1913>
- Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda,

- M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>
- Pachano, T., Nievas, Y. R., Lizarraga, A., Johnson, P. J., Strobl-Mazzulla, P. H., & de Miguel, N. (2017). Epigenetics regulates transcription and pathogenesis in the parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cellular Microbiology*, *19*(6), e12716. <https://doi.org/10.1111/cmi.12716>
- Paranaiba, L. F., Guarneri, A. A., Torrecilhas, A. C., Melo, M. N., & Soares, R. P. (2019). Extracellular vesicles isolated from *Trypanosoma cruzi* affect early parasite migration in the gut of *Rhodnius prolixus* but not in *Triatoma infestans*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *114*, e190217. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190217>
- Pellegrin, S., & Mellor, H. (2005). The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Current Biology: CB*, *15*(2), 129-133. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.011>
- Pereira-Neves, A., & Benchimol, M. (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: New insights. *Biology of the Cell*, *99*(2), 87-101. <https://doi.org/10.1042/BC20060084>
- Peterman, T. A., Tian, L. H., Metcalf, C. A., Satterwhite, C. L., Malotte, C. K., DeAugustine, N., Paul, S. M., Cross, H., Rietmeijer, C. A., Douglas, J. M., & RESPECT-2 Study Group. (2006). High incidence of new sexually transmitted infections in the year following a sexually transmitted infection: A case for rescreening. *Annals of Internal Medicine*, *145*(8), 564-572. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-8-200610170-00005>
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(2), 300-317.
- Pollitt, L. C., Mideo, N., Drew, D. R., Schneider, P., Colegrave, N., & Reece, S. E. (2011). Competition and the Evolution of Reproductive Restraint in Malaria Parasites. *The American naturalist*, *177*(3), 358-367. <https://doi.org/10.1086/658175>

- Poole, D. N., & McClelland, R. S. (2013). Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually Transmitted Infections*, *89*(6), 418-422. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051075>
- Quan, J.-H., Choi, I.-W., Yang, J.-B., Zhou, W., Cha, G.-H., Zhou, Y., Ryu, J.-S., & Lee, Y.-H. (2014). *Trichomonas vaginalis* metalloproteinase induces mTOR cleavage of SiHa cells. *The Korean Journal of Parasitology*, *52*(6), 595-603. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.6.595>
- Rada, P., Hrdý, I., Zdrha, A., Narayanasamy, R. K., Smutná, T., Horáčková, J., Harant, K., Beneš, V., Ong, S.-C., Tsai, C.-Y., Luo, H.-W., Chiu, C.-H., Tang, P., & Tachezy, J. (2022). Double-Stranded RNA Viruses Are Released From *Trichomonas vaginalis* Inside Small Extracellular Vesicles and Modulate the Exosomal Cargo. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 893692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.893692>
- Rae, D. O., & Crews, J. E. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, *22*(3), 595-611. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.001>
- Rai, A. K., & Johnson, P. J. (2019). *Trichomonas vaginalis* extracellular vesicles are internalized by host cells using proteoglycans and caveolin-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(43), 21354. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912356116>
- 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). <https://doi.org/10.1111/cmi.12672>
- Ramírez-Weber, F.-A., & Kornberg, T. B. (1999). Cytonemes: Cellular Processes that Project to the Principal Signaling Center in *Drosophila* Imaginal Discs. *Cell*, *97*(5), 599-607. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80771-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80771-0)

- Regev-Rudzki, N., Wilson, D. W., Carvalho, T. G., Sisquella, X., Coleman, B. M., Rug, M., Bursac, D., Angrisano, F., Gee, M., Hill, A. F., Baum, J., & Cowman, A. F. (2013). Cell-Cell Communication between Malaria-Infected Red Blood Cells via Exosome-like Vesicles. *Cell*, 153(5), 1120-1133. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.029>
- Rendón-Gandarilla, F. J., Ramón-Luing, L. de L. A., Ortega-López, J., Rosa de Andrade, I., Benchimol, M., & Arroyo, R. (2013). The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *BioMed Research International*, 2013, 561979. <https://doi.org/10.1155/2013/561979>
- Rendon-Gandarilla, F. J., Ramon-Luing Lde, L., Ortega-Lopez, J., Rosa de Andrade, I., Benchimol, M., & Arroyo, R. (2013). The TvLEGU-1, a legumain-like cysteine proteinase, plays a key role in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Biomed Res Int*, 2013, 561979. <https://doi.org/10.1155/2013/561979>
- Retana Moreira, L., Prescilla-Ledezma, A., Cornet-Gomez, A., Linares, F., Jódar-Reyes, A. B., Fernandez, J., Ibarrola Vannucci, A. K., De Pablos, L. M., & Osuna, A. (2021). Biophysical and Biochemical Comparison of Extracellular Vesicles Produced by Infective and Non-Infective Stages of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5183. <https://doi.org/10.3390/ijms22105183>
- Retana Moreira, L., Rodríguez Serrano, F., & Osuna, A. (2019). Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), e0007163. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>
- Riestra, A. M., Gandhi, S., Sweredoski, M. J., Moradian, A., Hess, S., Urban, S., & Johnson, P. J. (2015). A *Trichomonas vaginalis* Rhomboid Protease and Its Substrate Modulate Parasite Attachment and Cytolysis of Host Cells. *PLoS Pathog*, 11(12), e1005294. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005294>

- Rilla, K., Pasonen-Seppänen, S., Deen, A. J., Koistinen, V. V. T., Wojciechowski, S., Oikari, S., Kärnä, R., Bart, G., Törrönen, K., Tammi, R. H., & Tammi, M. I. (2013). Hyaluronan production enhances shedding of plasma membrane-derived microvesicles. *Experimental Cell Research*, *319*(13), 2006-2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.05.021>
- Robinson, D. N., & Cooley, L. (1996). Stable intercellular bridges in development: The cytoskeleton lining the tunnel. *Trends in Cell Biology*, *6*(12), 474-479.  
[https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)84945-2](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)84945-2)
- Rocha, D. A. P., Filho, R. A. A. B., Mariño, J. M., & dos Santos, C. M. B. (2014). «Hidden» sexually transmitted infections among women in primary care health services, Amazonas, Brazil. *International Journal of STD & AIDS*, *25*(12), 878-886.  
<https://doi.org/10.1177/0956462414523742>
- Roiko, M. S., & Carruthers, V. B. (2009). New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. *Cellular Microbiology*, *11*(10), 1444-1452. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01357.x>
- Rossi, I. V., Ferreira Nunes, M. A., Vargas-Otalora, S., da Silva Ferreira, T. C., Cortez, M., & Ramirez, M. I. (2021). Extracellular Vesicles during TriTryps infection: Complexity and future challenges. *Molecular Immunology*, *132*, 172-183.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.01.008>
- Rotty, J. D., Wu, C., Haynes, E. M., Suarez, C., Winkelman, J. D., Johnson, H. E., Haugh, J. M., Kovar, D. R., & Bear, J. E. (2015). Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and -independent pathways. *Developmental Cell*, *32*(1), 54-67.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.026>
- Rouault, H., & Hakim, V. (2012). Different cell fates from cell-cell interactions: Core architectures of two-cell bistable networks. *Biophysical Journal*, *102*(3), 417-426.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.11.4022>

- Rowley, J., Vander Hoorn, S., Korenromp, E., Low, N., Unemo, M., Abu-Raddad, L. J., Chico, R. M., Smolak, A., Newman, L., Gottlieb, S., Thwin, S. S., Broutet, N., & Taylor, M. M. (2019). Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bulletin of the World Health Organization*, *97*(8), 548-562P. <https://doi.org/10.2471/BLT.18.228486>
- Roy, S., Huang, H., Liu, S., & Kornberg, T. B. (2014). Cytoneme-Mediated Contact-Dependent Transport of the Drosophila Decapentaplegic Signaling Protein. *Science*, *343*(6173), 1244624. <https://doi.org/10.1126/science.1244624>
- Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., & Gerdes, H.-H. (2004). Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport. *Science*, *303*(5660), 1007-1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>
- Ryan, C. M., Mehlert, A., Richardson, J. M., Ferguson, M. A., & Johnson, P. J. (2011). Chemical structure of *Trichomonas vaginalis* surface lipoglycan: A role for short galactose (beta1-4/3) N-acetylglucosamine repeats in host cell interaction. *J Biol Chem*, *286*(47), 40494-40508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280578>
- Saha, N., Dutta, S., Datta, S. P., & Sarkar, S. (2018). The minimal ESCRT machinery of *Giardia lamblia* has altered inter-subunit interactions within the ESCRT-II and ESCRT-III complexes. *European Journal of Cell Biology*, *97*(1), 44-62. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.11.004>
- Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E., & Emr, S. D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*, *136*(1), 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.013>
- Salomón, M. C., Martínez, N., Delgado, D., González Arra, C., Bittar, V., & González, N. (2011). [Trichomonas vaginalis prevalence in sex workers]. *Medicina*, *71*(5), 429-431.

- Sanders, T. A., Llagostera, E., & Barna, M. (2013). Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature*, *497*(7451), 628-632. <https://doi.org/10.1038/nature12157>
- Sardana, S., Sodhani, P., Agarwal, S. S., Sehgal, A., Roy, M., Singh, V., Bhatnagar, P., & Murthy, N. S. (1994). Epidemiologic analysis of *Trichomonas vaginalis* infection in inflammatory smears. *Acta Cytologica*, *38*(5), 693-697.
- Schifferli, J. A. (2011). Microvesicles are messengers. *Seminars in Immunopathology*, *33*(5), 393-394. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0276-6>
- Schöneberg, J., Lee, I.-H., Iwasa, J. H., & Hurley, J. H. (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *18*(1), 5-17. PubMed. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.121>
- Schulz, E., Karagianni, A., Koch, M., & Fuhrmann, G. (2020). Hot EVs – How temperature affects extracellular vesicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *146*, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.010>
- Schwebke, J. R., & Burgess, D. (2004). Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, *17*(4), 794-803, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.794-803.2004>
- Secor, W. E., Meites, E., Starr, M. C., & Workowski, K. A. (2014). Neglected Parasitic Infections in the United States: Trichomoniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(5), 800-804. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0723>
- Shah, A. D., Goode, R. J. A., Huang, C., Powell, D. R., & Schittenhelm, R. B. (2020). LFQ-Analyst: An Easy-To-Use Interactive Web Platform To Analyze and Visualize Label-Free Proteomics Data Preprocessed with MaxQuant. *Journal of Proteome Research*, *19*(1), 204-211. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00496>
- Sharma, M., Morgado, P., Zhang, H., Ehrenkauf, G., Manna, D., & Singh, U. (2020). Characterization of Extracellular Vesicles from *Entamoeba histolytica* Identifies Roles in



- Intercellular Communication That Regulates Parasite Growth and Development.  
*Infection and Immunity*, 88(10), e00349-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00349-20>
- Shifrin Jr., D. A., Demory Beckler, M., Coffey, R. J., & Tyska, M. J. (2013). Extracellular vesicles: Communication, coercion, and conditioning. *Mol Biol Cell*, 24(9), 1253-1259.  
<https://doi.org/10.1091/mbc.E12-08-0572>
- Siddiq, A., Allain, T., Dong, G., Olivier, M., & Buret, A. (2020). Giardia extracellular vesicles disrupt intestinal epithelial junctions and inhibit the growth of commensal bacteria while increasing their swimming motility. *The FASEB Journal*, 34(S1), 1-1.  
<https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.00515>
- Silva, V. O., Maia, M. M., Torrecilhas, A. C., Taniwaki, N. N., Namiyama, G. M., Oliveira, K. C., Ribeiro, K. S., Toledo, M. D. S., Xander, P., & Pereira-Chiocola, V. L. (2018). Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. *Parasite Immunology*, 40(9), e12571. <https://doi.org/10.1111/pim.12571>
- Silverman, J. S., Muratore, K. A., & Bangs, J. D. (2013). Characterization of the late endosomal ESCRT machinery in *Trypanosoma brucei*. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 14(10), 1078-1090. <https://doi.org/10.1111/tra.12094>
- Silvestre, A., Plaze, A., Berthon, P., Thibeaux, R., Guillen, N., & Labruyère, E. (2015). In *Entamoeba histolytica*, a BspA family protein is required for chemotaxis toward tumour necrosis factor. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 2(7), 235-246.  
<https://doi.org/10.15698/mic2015.07.214>
- Singh, S., Singh, G., Singh, A. K., Gautam, G., Farmer, R., Lodhi, S. S., & Wadhwa, G. (2011). Prediction and analysis of paralogous proteins in *Trichomonas vaginalis* genome. *Bioinformatics*, 6(1), 31-34. <https://doi.org/10.6026/97320630006031>
- Sisquella, X., Ofir-Birin, Y., Pimentel, M. A., Cheng, L., Abou Karam, P., Sampaio, N. G., Penington, J. S., Connolly, D., Giladi, T., Scicluna, B. J., Sharples, R. A., Waltmann, A., Avni, D., Schwartz, E., Schofield, L., Porat, Z., Hansen, D. S., Papenfuss, A. T., Eriksson,

- E. M., ... Regev-Rudzki, N. (2017). Malaria parasite DNA-harboring vesicles activate cytosolic immune sensors. *Nature Communications*, 8(1), 1985.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02083-1>
- Skruber, K., Warp, P. V., Shklyarov, R., Thomas, J. D., Swanson, M. S., Henty-Ridilla, J. L., Read, T.-A., & Vitriol, E. A. (2020). Arp2/3 and Mena/VASP Require Profilin 1 for Actin Network Assembly at the Leading Edge. *Current Biology: CB*, 30(14), 2651-2664.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.085>
- Sobel, J. D., Nyirjesy, P., & Brown, W. (2001). Tinidazole therapy for metronidazole-resistant vaginal trichomoniasis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(8), 1341-1346.  
<https://doi.org/10.1086/323034>
- Somlata, null, Bhattacharya, S., & Bhattacharya, A. (2011). A C2 domain protein kinase initiates phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature Communications*, 2, 230. <https://doi.org/10.1038/ncomms1199>
- Sorvillo, F., Smith, L., Kerndt, P., & Ash, L. (2001). *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerging Infectious Diseases*, 7(6), 927-932.  
<https://doi.org/10.3201/eid0706.010603>
- Soto-Serna, L. E., Diupotex, M., Zamora-Chimal, J., Ruiz-Remigio, A., Delgado-Domínguez, J., Cervantes-Sarabia, R. B., Méndez-Bernal, A., Escalona-Montaño, A. R., Aguirre-García, M. M., & Becker, I. (2020). *Leishmania mexicana*: Novel Insights of Immune Modulation through Amastigote Exosomes. *Journal of Immunology Research*, 2020, 8894549. <https://doi.org/10.1155/2020/8894549>
- Sparks, J. M. (1991). Vaginitis. *The Journal of Reproductive Medicine*, 36(10), 745-752.
- Štáfková, J., Rada, P., Meloni, D., Žárský, V., Smutná, T., Zimmann, N., Harant, K., Pompach, P., Hrdý, I., & Tachezy, J. (2018). Dynamic secretome of *Trichomonas vaginalis*: Case study

of  $\beta$ -amylases \*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(2), 304-320.

<https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000434>

Stark, J. R., Judson, G., Alderete, J. F., Mundodi, V., Kucknoor, A. S., Giovannucci, E. L., Platz, E.

A., Sutcliffe, S., Fall, K., Kurth, T., Ma, J., Stampfer, M. J., & Mucci, L. A. (2009).

Prospective study of *Trichomonas vaginalis* infection and prostate cancer incidence and mortality: Physicians' Health Study. *J Natl Cancer Inst*, 101(20), 1406-1411.

<https://doi.org/10.1093/jnci/djp306>

Stijlemans, B., Caljon, G., Van Den Abbeele, J., Van Ginderachter, J. A., Magez, S., & De Trez, C.

(2016). Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma brucei* within the Mammalian Host: Progression to Pathogenicity. *Frontiers in Immunology*, 7, 233.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00233>

Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H., & Brech, A. (2009). Multivesicular endosome

biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 10(7), 925-937.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>

Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, J. F., Chang, T. H., Gaydos, C. A., Zenilman, J. M., De

Marzo, A. M., Willett, W. C., & Platz, E. A. (2006). Plasma antibodies against

*Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol*

*Biomarkers Prev*, 15(5), 939-945. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-05-0781>

Sutcliffe, S., & Platz, E. A. (2008). Inflammation and prostate cancer: A focus on infections.

*Current Urology Reports*, 9(3), 243. <https://doi.org/10.1007/s11934-008-0042-z>

Sutton, M., Sternberg, M., Koumans, E. H., McQuillan, G., Berman, S., & Markowitz, L. (2007).

The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(10), 1319-1326.

<https://doi.org/10.1086/522532>

- Swygard, H., Sena, A., Hobbs, M., & Cohen, M. (2004). Trichomoniasis: Clinical manifestations, diagnosis and management. *Sexually Transmitted Infections*, *80*(2), 91-95.  
<https://doi.org/10.1136/sti.2003.005124>
- Szempruch, A. J., Dennison, L., Kieft, R., Harrington, J. M., & Hajduk, S. L. (2016). Sending a message: Extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.110>
- Szempruch, A. J., Sykes, S. E., Kieft, R., Dennison, L., Becker, A. C., Gartrell, A., Martin, W. J., Nakayasu, E. S., Almeida, I. C., Hajduk, S. L., & Harrington, J. M. (2016). Extracellular Vesicles from *Trypanosoma brucei* Mediate Virulence Factor Transfer and Cause Host Anemia. *Cell*, *164*(1-2), 246-257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>
- Tabb, D. L., McDonald, W. H., & Yates, J. R. 3rd. (2002). DTASelect and Contrast: Tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics. *Journal of Proteome Research*, *1*(1), 21-26. <https://doi.org/10.1021/pr015504q>
- Tan, M. I. (2016). Cell and molecular biology for diagnostic and therapeutic technology. *Journal of Physics: Conference Series*, *694*(1), 012001. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/694/1/012001>
- Taylor, M. L., Mainous 3rd, A. G., & Wells, B. J. (2005). Prostate cancer and sexually transmitted diseases: A meta-analysis. *Fam Med*, *37*(7), 506-512.
- Teis, D., Saksena, S., & Emr, S. D. (2008). Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Developmental Cell*, *15*(4), 578-589. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.013>
- Teis, D., Saksena, S., Judson, B. L., & Emr, S. D. (2010). ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *The EMBO Journal*, *29*(5), 871-883. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.408>

- Teng, F., & Fussenegger, M. (2021). Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Advanced Science*, *8*(1), 2003505.  
<https://doi.org/10.1002/advs.202003505>
- Theos, A. C., Truschel, S. T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D. C., Berson, J. F., Thomas, P. C., Raposo, G., & Marks, M. S. (2006). A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Developmental Cell*, *10*(3), 343-354.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.012>
- They, C. (2011). Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep*, *3*, 15. <https://doi.org/10.3410/b3-15>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): A position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science*, *319*(5867), 1244.  
<https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Trocoli Torrecilhas, A. C., Tonelli, R. R., Pavanelli, W. R., da Silva, J. S., Schumacher, R. I., de Souza, W., E Silva, N. C., de Almeida Abrahamsohn, I., Colli, W., & Manso Alves, M. J. (2009). Trypanosoma cruzi: Parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*, *11*(1), 29-39.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.10.003>

- Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2013). Trichomonas vaginalis exosomes deliver cargo to host cells and mediate host-parasite interactions. *PLoS Pathog*, *9*(7), e1003482.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003482>
- Twu, O., Dessi, D., Vu, A., Mercer, F., Stevens, G. C., de Miguel, N., Rappelli, P., Cocco, A. R., Clubb, R. T., Fiori, P. L., & Johnson, P. J. (2014). Trichomonas vaginalis homolog of macrophage migration inhibitory factor induces prostate cell growth, invasiveness, and inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(22), 8179-8184.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1321884111>
- Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, *11*(12), 2301-2319.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
- Umaer, K., & Bangs, J. D. (2020). Late ESCRT machinery mediates the recycling and Rescue of Invariant Surface Glycoprotein 65 in Trypanosoma brucei. *Cellular Microbiology*, *22*(11), e13244. <https://doi.org/10.1111/cmi.13244>
- Van Der Pol, B., Kwok, C., Pierre-Louis, B., Rinaldi, A., Salata, R. A., Chen, P.-L., van de Wijgert, J., Mmiro, F., Mugerwa, R., Chipato, T., & Morrison, C. S. (2008). Trichomonas vaginalis infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *The Journal of Infectious Diseases*, *197*(4), 548-554. <https://doi.org/10.1086/526496>
- Van Engelenburg, S. B., Shtengel, G., Sengupta, P., Waki, K., Jarnik, M., Ablan, S. D., Freed, E. O., Hess, H. F., & Lippincott-Schwartz, J. (2014). Distribution of ESCRT machinery at HIV assembly sites reveals virus scaffolding of ESCRT subunits. *Science*, *343*(6171), 653-656. <https://doi.org/10.1126/science.1247786>
- 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>
- van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Vartak, D. G., & Gemeinhart, R. A. (2007). Matrix metalloproteases: Underutilized targets for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 15(1), 1-20. <https://doi.org/10.1080/10611860600968967>
- Vasioukhin, V., & Fuchs, E. (2001). Actin dynamics and cell–cell adhesion in epithelia. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1), 76-84. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00177-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00177-0)
- Viikki, M., Pukkala, E., Nieminen, P., & Hakama, M. (2000). Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, 39(1), 71-75. <https://doi.org/10.1080/028418600431003>
- Villagomez, M., Szabo, E., Podcheko, A., Feng, T., Papp, S., & Opas, M. (2009). Calreticulin and focal-contact-dependent adhesion. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 87(4), 545-556. <https://doi.org/10.1139/o09-016>
- Wang, G., Hu, H.-B., Chang, Y., Huang, Y., Song, Z.-Q., Zhou, S.-B., Chen, L., Zhang, Y.-C., Wu, M., Tu, H.-Q., Yuan, J.-F., Wang, N., Pan, X., Li, A.-L., Zhou, T., Zhang, X.-M., He, K., & Li, H.-Y. (2019). Rab7 regulates primary cilia disassembly through cilia excision. *Journal of Cell Biology*, 218(12), 4030-4041. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811136>
- Waters, L. J., Dave, S. S., Deayton, J. R., & French, P. D. (2005). Recalcitrant *Trichomonas vaginalis* infection—A case series. *International Journal of STD & AIDS*, 16(7), 505-509. <https://doi.org/10.1258/0956462054308314>
- Wehrl, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., & Szczepek, A. J. (2004). From the inside out—Processing of the Chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial

- adhesion and activation of human host cells. *Molecular Microbiology*, 51(2), 319-334.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03838.x>
- Wemmer, M., Azmi, I., West, M., Davies, B., Katzmann, D., & Odorizzi, G. (2011). Bro1 binding to Snf7 regulates ESCRT-III membrane scission activity in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 192(2), 295-306. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007018>
- Wenzel, E. M., Schultz, S. W., Schink, K. O., Pedersen, N. M., Nähse, V., Carlson, A., Brech, A., Stenmark, H., & Raiborg, C. (2018). Concerted ESCRT and clathrin recruitment waves define the timing and morphology of intraluminal vesicle formation. *Nature Communications*, 9(1), 2932. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05345-8>
- Wesolowski, J., & Paumet, F. (2010). SNARE motif: A common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion. *Virulence*, 1(4), 319-324. PubMed.  
<https://doi.org/10.4161/viru.1.4.12195>
- WHO. (2018). *Report on global sexually transmitted infection surveillance. 2018*. 63.
- Witwer, K. W., Soekmadji, C., Hill, A. F., Wauben, M. H., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Falcon-Perez, J. M., Gardiner, C., Hochberg, F., Kurochkin, I. V., Lötvall, J., Mathivanan, S., Nieuwland, R., Sahoo, S., Tahara, H., Torrecilhas, A. C., Weaver, A. M., Yin, H., Zheng, L., ... Théry, C. (2017). Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: Building bridges to reproducibility. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1396823.  
<https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1396823>
- Woehle, C., Kusdian, G., Radine, C., Graur, D., Landan, G., & Gould, S. B. (2014). The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from functional neighbouring genes. *BMC Genomics*, 15(1), 906.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-906>
- Wohlschlegel, J. A. (2009). Identification of SUMO-Conjugated Proteins and their SUMO Attachment Sites Using Proteomic Mass Spectrometry. En H. D. Ulrich (Ed.), *SUMO Protocols* (pp. 33-49). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-566-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-566-4_3)



- Wølnner-Hanssen, P., Krieger, J. N., Stevens, C. E., Kiviat, N. B., Koutsky, L., Critchlow, C., DeRouen, T., Hillier, S., & Holmes, K. K. (1989). Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *JAMA*, *261*(4), 571-576.  
<https://doi.org/10.1001/jama.1989.03420040109029>
- Wood, W., & Martin, P. (2002). Structures in focus—Filopodia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *34*(7), 726-730. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(01\)00172-8](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00172-8)
- Wowk, P. F., Zardo, M. L., Miot, H. T., Goldenberg, S., Carvalho, P. C., & Mörking, P. A. (2017). Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. *Proteomics*, *17*(15-16). <https://doi.org/10.1002/pmic.201600477>
- Wu, Z., Wang, L., Li, J., Wang, L., Wu, Z., & Sun, X. (2018). Extracellular Vesicle-Mediated Communication Within Host-Parasite Interactions. *Frontiers in Immunology*, *9*, 3066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03066>
- Wyllie, M. P., & Ramirez, M. I. (2017). Microvesicles released during the interaction between *Trypanosoma cruzi* TcI and TcII strains and host blood cells inhibit complement system and increase the infectivity of metacyclic forms of host cells in a strain-independent process. *Pathogens and Disease*, *75*(7), ftx077. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx077>
- Yang, B. A., Westerhof, T. M., Sabin, K., Merajver, S. D., & Aguilar, C. A. (2021). Engineered Tools to Study Intercellular Communication. *Advanced Science*, *8*(3), 2002825. <https://doi.org/10.1002/advs.202002825>
- Yang, M., Coppens, I., Wormsley, S., Baevova, P., Hoppe, H. C., & Joiner, K. A. (2004). The *Plasmodium falciparum* Vps4 homolog mediates multivesicular body formation. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 17), 3831-3838. <https://doi.org/10.1242/jcs.01237>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Bedina Zavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever,

- O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 27066.  
<https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yao, C., Donelson, J. E., & Wilson, M. E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 132(1), 1-16. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00211-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00211-1)
- Yao, C., & Köster, L. S. (2015). *Trichomonas foetus* infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. *Veterinary Research*, 46(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0169-0>
- Ye, W., Chew, M., Hou, J., Lai, F., Leopold, S. J., Loo, H. L., Ghose, A., Dutta, A. K., Chen, Q., Ooi, E. E., White, N. J., Dondorp, A. M., Preiser, P., & Chen, J. (2018). Microvesicles from malaria-infected red blood cells activate natural killer cells via MDA5 pathway. *PLoS Pathogens*, 14(10), e1007298. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007298>
- Yoon, Y. J., Kim, O. Y., & Gho, Y. S. (2014). Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Rep*, 47(10), 531-539.  
<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.10.164>
- Zhang, W., Zhao, P., Xu, X.-L., Cai, L., Song, Z.-S., Cao, D.-Y., Tao, K.-S., Zhou, W.-P., Chen, Z.-N., & Dou, K.-F. (2013). Annexin A2 Promotes the Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro by Regulating the Shedding of CD147-Harboring Microvesicles from Tumor Cells. *PLOS ONE*, 8(8), e67268.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067268>
- Zhou, X., Franklin, R. A., Adler, M., Jacox, J. B., Bailis, W., Shyer, J. A., Flavell, R. A., Mayo, A., Alon, U., & Medzhitov, R. (2018). Circuit Design Features of a Stable Two-Cell System. *Cell*, 172(4), 744-757.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.015>

Zubáčová, Z., Cimbůrek, Z., & Tachezy, J. (2008). Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 161(1), 49-54.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.06.004>

El presente documento es la versión final de la tesis, la cual incluye los cambio/correcciones sugeridos por los jurados.



Nehuén Salas



Natalia de Miguel



Verónica Coceres