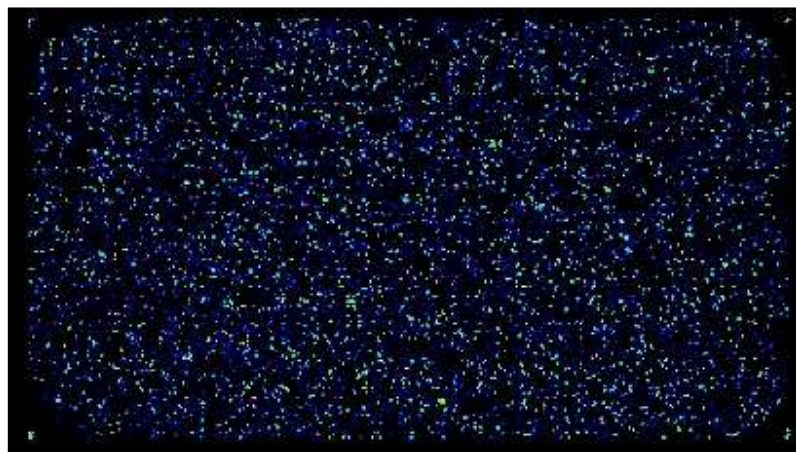


ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR HUMANA FRENTE A LA INVASIÓN POR *TRYPANOSOMA* *CRUZI*.



ALEJANDRA GARCÍA

Tutor: Dr. Carlos Robello

Co-tutor: Mag. Gonzalo Greif

Unidad de Biología Molecular

Montevideo, Uruguay

2013

DEDICATORIA:

La presente Tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo pude concluir mi carrera.

A mis padres, por brindarme todos los recursos y herramientas necesarias para formarme, por contenerme emocionalmente y guiarme en todo momento.

A mis hermanos, por su apoyo y confianza en todo momento.

A mi pareja y amigos que siempre han estado presentes, que me han brindado consejos y su apoyo.

A todos quienes se han cruzado en mi camino y que compartieron su sabiduría, permitiéndome realizar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer especialmente al Dr. Carlos Robello por aceptarme como estudiante en su laboratorio y permitirme realizar este trabajo. También agradezco al Mag, Gonzalo Greif por guiarme, dedicar su tiempo e impartir su conocimiento.

A todos mis compañeros de la UBM por el apoyo y cariño que me han brindado, en particular a la Mag. María Laura Chiribao y a la Lic. Pilar Zorrilla, quienes me han ayudado en numerosas ocasiones durante este trabajo.

Quiero agradecer a todos quienes me han apoyado y han participado de una manera u otra en la realización de este trabajo. Sin dudas lo han enriquecido y es el resultado de mucho esfuerzo, dedicación, consejos e ideas que me han aportado.

DEDICATORIA:	3
AGRADECIMIENTOS:	4
LISTADO DE TABLAS:	7
LISTADO DE FIGURAS:	7
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1 RESEÑA DE LA ENFERMEDAD	11
2.2 EL CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i>	13
2.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	16
2.4 RESPUESTA CELULAR A LA INFECCIÓN POR <i>T. CRUZI</i>	17
2.4.1 Apoptosis	17
2.4.2 Respuesta inflamatoria	18
2.4.3 Reorganización del citoesqueleto	20
2.4.4 Receptores Tipo Toll	20
2.5 MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN	23
2.6 SIGNIFICANCE ANALYSIS OF MICROARRAYS (SAM)	23
RESULTADOS PRELIMINARES	26
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GENERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 INFECCIÓN DE CÉLULAS HELA	27
4.2 TÉCNICA DE MICROARREGLOS	28
4.3 IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS	31
4.4 ESTUDIO DE ONTOLOGÍA DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS CON RESPECTO AL CONTROL	32
4.5 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE MICROARREGLOS MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL	32
➤ Síntesis de ADN copia (ADNc)	32
➤ Diseño de cebadores	32
➤ PCR en tiempo real	33
5. RESULTADOS	34
5.1 TÉCNICA DE MICROARREGLOS	34
5.2 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL MICROARREGLO Y DE LAS RÉPLICAS BIOLÓGICAS	35
➤ Reporte de control de calidad de Agilent	35
➤ Análisis de componentes principales	36
5.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE PRESENTAN UNA EXPRESIÓN DIFERENCIAL SIGNIFICATIVA CON RESPECTO AL CONTROL	37
5.4 ESTUDIO DE ONTOLOGÍA DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS CON RESPECTO AL CONTROL	44
5.5 ANÁLISIS DE GENES INDIVIDUALES MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL	57
6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	60

6.1	IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE PRESENTAN UNA EXPRESIÓN DIFERENCIAL SIGNIFICATIVA CON RESPECTO AL CONTROL.	60
6.2	ESTUDIO DE LA ONTOLOGÍA DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS CON RESPECTO AL CONTROL.....	62
6.3	VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE MICROARREGLOS.	63
7	BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO		70
	<i>A1. Cebadores diseñados para realizar RT-PCR en tiempo real.</i>	<i>70</i>
	<i>A2. Reporte de Control de Calidad de Agilent Technologies</i>	<i>71</i>

LISTADO DE TABLAS

IV-1, Especificaciones del microarreglo utilizado para el ensayo, página 30.

V-2, Valores de rendimiento y actividad específica, calculados a partir de la concentración de fluoróforo y Abs 260/280, página 36.

V-3, Valores de F.C obtenidos mediante el test estadístico SAM para cada una de las condiciones experimentales, página 44.

V-4, Genes vinculados a la apoptosis. En rojo se resaltan los genes sobre –expresados y en verde los sub-expresados con respecto al control, página 48.

V-5, Genes diferencialmente expresados con respecto al control vinculados a la respuesta del sistema inmune e inflamación, página 54.

V-6, Genes diferencialmente expresados con respecto al control vinculados a la respuesta del sistema inmune e inflamación, página 55.

V-7, Genes vinculados a la vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLRs), página 57.

V-8, Tabla con valores de *F.C.* para cada gen en los tiempos 0, 3 y 6 horas, página 59.

LISTADO DE FIGURAS:

2-1, Representación del ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* que alterna entre el Triatoma (vector) y el humano (huésped mamífero), página 15.

4-2, Esquema de la estrategia experimental, página 28.

4-3, Esquema del protocolo de la técnica de microarreglos del manual de *Agilent Technologies- One color Microarray- Based gene expression Analysis*, página 32.

5-4, Imagen obtenida luego de realizar el escáner de microarreglos de un solo color, utilizando el canal verde, página 37.

- 5-5, Gráfico de análisis de componentes principales, página 38.
- 5-6, Perfil de expresión parcial de los genes obtenido en el programa MeV, página 41.
- 5-7, Representación gráfica en escala real del número de genes diferencialmente expresados con respecto al control, en los distintos tiempos de incubación de las células HeLa con *T. cruzi*, página 42.
- 5-8, Representación gráfica de los valores de los valores de *fold change* en cada tiempo de infección con *T. cruzi*, de los genes IL8, CCL20, CXCL3, CXCL2, LOC 83174, CCL8, página 44.
- 5-9, Diagrama de Venn de los genes únicos sub-expresados con respecto al control para 0hs, 3hs y 6hs de incubación con *T. cruzi*, página 35.
- 5-10, Perfil de expresión de los genes sub-expresados con respecto al control que son compartidos en más de un tiempo., página 46.
- 5-11, Vía de señalización de IL-6 que inhibe la apoptosis, página 49.
- 5-12, Vía de señalización de TNF- α e IL1- β , página 50.
- 5-13, Vía de activación de NFkB mediante IL1 α , página 51.
- 5-14, Vía de inhibición de la apoptosis mediante ESR1 y ESR2, página 52.
- 5-15, Representación de la vía de receptores tipo Toll (www.wikipathways.org) para Homo Sapiens, página 58.
- 5-16, Curvas de fusión para los transcritos de la IL8, página 60.
- 5-17, Gráficos que representan la expresión relativa obtenida para cada gen utilizando la técnica de microarreglos y RT-PCR en tiempo real, página 61.
- 6-18, Gráfico de líneas del número de genes sobre y sub-expresados con respecto al control para los tres tiempos de incubación de las células HeLa con *T. cruzi* (0hs, 3hs y 6hs), página 63.

1. RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario flagelado causante de la enfermedad de Chagas. Presenta un complejo ciclo de vida que transcurre entre un hospedero invertebrado (insecto triatomineo) y un hospedero vertebrado (incluyendo humanos). La sintomatología de la enfermedad suele presentarse una o dos semanas posteriores a la infección y se divide en dos etapas: una fase inicial o aguda y una fase crónica que persiste en el individuo por el resto de su vida. El tratamiento se basa en fármacos que presentan efectos secundarios indeseados y son efectivos en la etapa aguda de la enfermedad.

Una característica de *T. cruzi* que lo diferencia de otros patógenos intracelulares, es que puede infectar una gran variedad de células de diferente origen, como por ejemplo macrófagos, fibroblastos, adipocitos, células musculares y cardíacas, entre otras. El estudio de la infección y persistencia de estos parásitos se ha centrado en dos aspectos principales: en el estudio de moléculas del parásito (proteínas de superficie y otros factores de virulencia que favorecen este proceso), y el estudio de la respuesta de células del sistema inmune, particularmente macrófagos, frente a la entrada del parásito a la célula. Este tipo de células están especializadas en el proceso de fagocitosis. Sin embargo, el éxito del parasitismo en la enfermedad de Chagas depende de su capacidad de invadir diferentes tejidos en los cuales el parásito persiste durante años, hasta que la enfermedad genera daños irreversibles. Por estas razones, consideramos de vital importancia investigar los procesos celulares involucrados en la invasión del *T. cruzi* en células del tipo no fagocíticas profesionales.

En este trabajo se propuso estudiar la invasión de *T. cruzi* en células no fagocíticas profesionales humanas mediante la técnica de microarreglos de expresión. Los experimentos de infección de células no fagocíticas, extracción de ARN, marcado y escaneo fueron realizados previamente en la Unidad de Biología Molecular. En esta tesis se realizó el análisis bioinformático con el fin de identificar los genes diferencialmente expresados con respecto a un control. A partir del cual, se obtuvo una lista de genes diferencialmente expresados y se identificó su ontología. Se estudió las vías vinculadas a la apoptosis, al proceso del sistema inmune e inflamación, a la reorganización del citoesqueleto y a los receptores tipo Toll. Por último, se seleccionaron genes a partir de la lista obtenida en el análisis bioinformático y se

realizó una validación del ensayo de microarreglos mediante RT-PCR en tiempo real. Podemos afirmar que los valores de expresión relativa de estos genes presentan un comportamiento similar desde el punto de vista del nivel de expresión en ambos ensayos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 **Reseña de la enfermedad**

La trypanosomiasis americana, también conocida como la enfermedad de Chagas es una infección sistémica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozooario intracelular obligado. Si bien este patógeno es capaz de promover una fuerte respuesta inmune mediada por linfocitos T [1, 2], el hospedero no es capaz de eliminarlo completamente de su organismo [3, 4]. Se cree que esto se debe a su capacidad de invadir células nucleadas, y de replicarse dentro de estas, evadiendo el sistema inmune del hospedero. La cronicidad de esta enfermedad está asociada a la infección de ciertos tejidos como el músculo cardíaco y esquelético [2].

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez por el Dr. Carlos Chagas [5]. En 1907, fue contratado para disminuir la transmisión de enfermedades en la industria de ferrocarriles. Un elevado número de esclavos y trabajadores de las vías férreas, que unían la ciudad de San Pablo y el corazón del Amazonas, morían de malaria, fiebre amarilla y otras enfermedades no diagnosticadas. Allí, trató una población que se quejaba sobre una frecuencia irregular de latidos y arritmia atípica, lo que indicaba una insuficiencia cardíaca, que frecuentemente llevaba a la muerte repentina. Interactuando con trabajadores de la zona, se informó sobre un insecto hematófago llamado *Triatoma infestans* (vinchuca) que habitaba las casas rurales y se alimentaba de la sangre humana. Para probar que este insecto era el vector de un agente infeccioso, Chagas estudió la flora de su sistema digestivo mediante microscopía óptica de luz. Pudo observar numerosos protozoarios flagelados similares al *Trypanosoma brucei*, descrito unos años antes por Forde [6]. El Dr. Chagas nombró al protozooario *Schizotrypanum cruzi*, en honor a su mentor (llamado Oswaldo Cruz), y luego su nombre fue cambiado a *Trypanosoma cruzi*.

En 1908, tuvo la oportunidad de documentar el primer caso de Trypanosomiasis Americana al encontrar al protozooario en la sangre de una niña de dos años, Bernice Soares de Moura [5]. Esta había sido picada reiteradas veces por vinchucas y la examinó durante el proceso agudo de fiebre, linfadenopatía, hepatosplenomegalia e infiltración generalizada. Un año después (1909), volvió a examinar a la niña y esta se encontraba bien, su temperatura era normal y no había parásitos en sangre. Bernice falleció a los 82 años.

(Salazar, Paz María. *La enfermedad de chagas, antecedentes históricos*, <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/antecedentes.html>, consulta: viernes 13 de junio 2013).

El cuadro clínico que presentó Bernice es característico de la enfermedad de Chagas. Como se comentará más adelante, en la mayoría de los individuos infectados la fase aguda se resuelve de manera espontánea. Y alrededor del 60-70% de los pacientes no vuelven a desarrollar síntomas.

Para estudiar la enfermedad, Chagas infectó monos con el parásito y estableció que desarrollaban la misma sintomatología que los humanos, por lo que pudo vincular a *T. cruzi* con la enfermedad. También estudió la fase aguda y crónica de la enfermedad así como su patogenicidad [7-9].

Chagas fue capaz de identificar el vector, el patógeno, las manifestaciones clínicas de la fase aguda, los diferentes estadios de ciclo de vida del *T. cruzi* en armadillos en estado salvaje [10] y posteriormente en monos de la especie *Samiri sciureus* [11]. Sin embargo, creía que la vía de infección principal era a través de la picadura del insecto. Emile Brumpt propuso en 1915 que la vía de infección principal era a través de las heces, y recién pudo ser probado por primera vez en 1932 por Silveira Díaz. En 1936, el Dr. Salvador Mazza junto a C. Benítez describió un síntoma llamado signo Mazza-Benítez (dacrioadenitis, inflamación de la glándula lagrimal) que puede o no aparecer al momento de la infección con el trypanosoma.

Se estima que esta enfermedad se originó hace millones de años entre animales salvajes [12] y se plantea que la transmisión del parásito al humano se dio de forma gradual, cuando estos comenzaron a convivir con los triatomíneos [13]. Esta convivencia se generó gracias al proceso de deforestación, construcción de viviendas y disminución del número de animales salvajes [14] lo que “obligó” a los Triatomas a buscar nuevos nichos en áreas domésticas y a adaptarse a la alimentación de sangre humana y de animales domésticos [12]. Si bien existen varias teorías sobre la evolución del *T. cruzi* [15-17] estudios recientes plantean que originalmente era un parásito de murciélagos que logró adaptarse a los mamíferos terrestres como hospederos [18]

El hallazgo de ADN de *T. cruzi* en momias de 9000 años de antigüedad del norte de Chile y sur de Perú confirma que la infección con este parásito prevalecía hace ya miles de años [19].

Si bien en 1909 se describió por primera vez la enfermedad [5], el primer caso reportado podría ser anterior. De acuerdo a la propia descripción que realizó Charles Darwin sobre el contacto que tuvo con la vinchuca, y los síntomas que presentó posteriormente, se cree que podría haber contraído la enfermedad durante la expedición a América del Sur en 1835 [20].

Se estima que entre 7 y 8 millones de personas se encuentran infectadas por *T. cruzi* en todo el mundo, la mayoría se encuentra en Latinoamérica. Un 30% de los enfermos crónicos desarrollan alteraciones cardíacas, y un 10% desarrolla alteraciones digestivas, neurológicas o mixtas (World Health Organization, *Chagas disease (American trypanosomiasis)*, 2013, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> consulta: 6 de mayo de 2013).

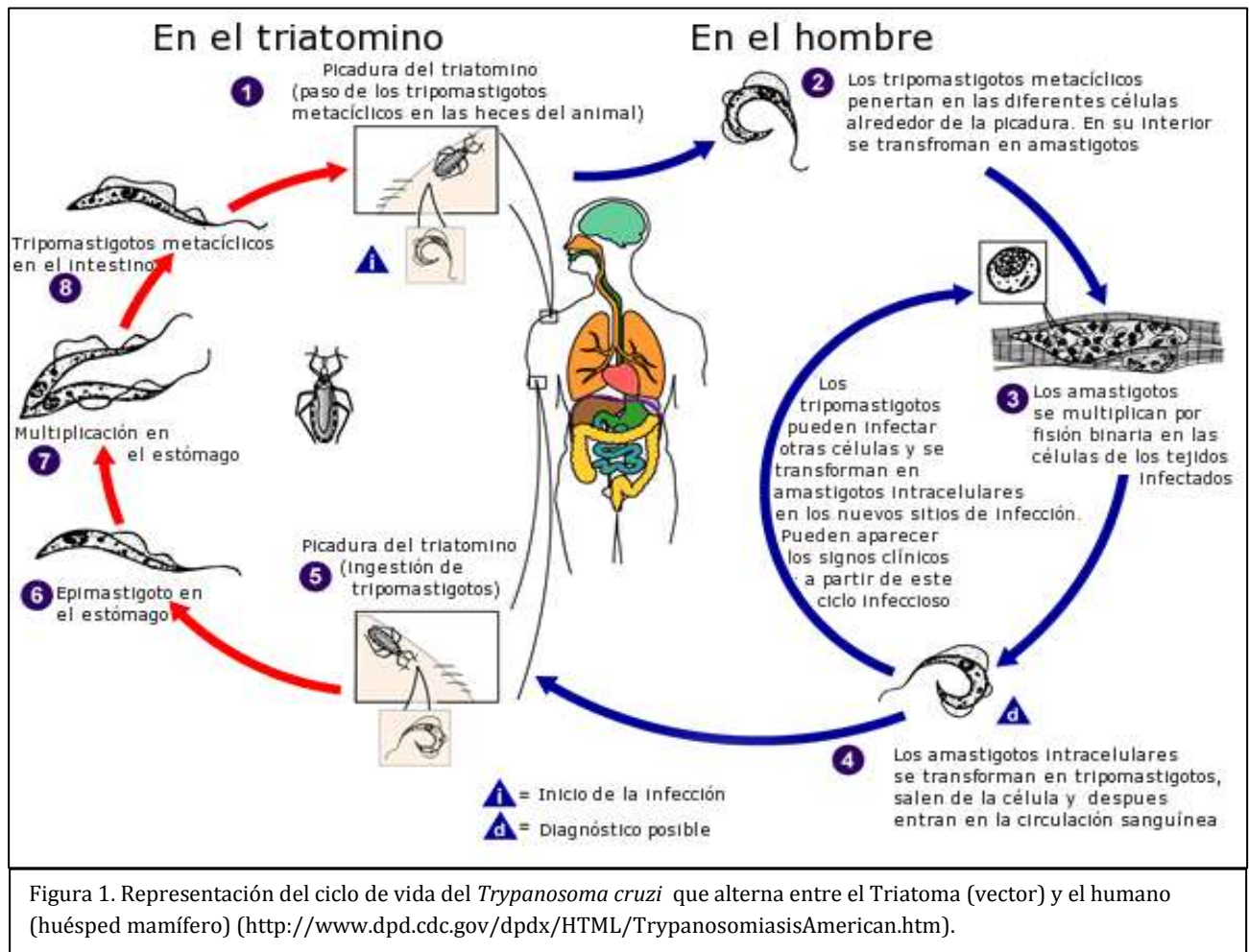
Si bien se han descrito más de 130 especies de Triatomas, no todos actúan como vectores. Entre los más importantes capaces de transmitir el parásito al humano se encuentran *Triatoma infestans* (el vector más importante, se encuentra en la región sur de América del Sur), *Rhodnius prolixus* (presente al norte de América del Sur y América Central) y *Triatoma dimidiata* (se encuentra en un área similar al anterior pero se extiende también a México)

El parásito se transmite a más de 150 animales domésticos (perros, gatos, entre otros) y a otros mamíferos a través de las heces de vectores infectados y también mediante la ingesta de alimentos infectados. También puede haber transmisión vertical del parásito a través de la leche materna entre madre e hijo y mediante transfusión sanguínea.

2.2 El ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida de este parásito se alterna entre hospederos vertebrados (entre los que se encuentran diversas especies de mamíferos) e invertebrados (vector) que no parecen verse afectados por la infección. Durante su ciclo de vida (figura 1), el parásito pasa por diferentes cambios de forma; epimastigotas y amastigotas (formas replicativas del parásito) y tripomastigotas metacíclico y tripomastigotas sanguíneos (formas infectivas, pero no replicativas). La forma amastigota es capaz de infectar células mediante un mecanismo dependiente de actina y mantener el ciclo replicativo intracelular [2].

Los distintos fenotipos que adopta están directamente relacionados al ambiente al cual se enfrenta durante su ciclo de vida (al pasar del vector al huésped). Por lo que gracias al pool de moléculas que expresa cada forma (mucinas, trans-sialidasas, fosfolípidos, entre otros) y a las distintas capacidades que adquiere o pierde el parásito (infectar y replicarse) es capaz de



persistir y replicarse de forma exitosa.

T. cruzi presenta familias génicas (que suelen encontrarse en regiones subtelméricas) que codifican para proteínas que se expresan en la superficie, y que están expandidas o contraídas según la cepa del parásito. En particular, las proteínas de superficie llamadas mucinas, son codificadas por una familia génica que se expresa en forma diferencial en los distintos estadios. Los epimastigotas presentan poca variabilidad génica de mucinas, mientras que los tripomastigotas y los amastigotas presentan una mayor variabilidad génica de mucinas. Estas

proteínas protegen al parásito del sistema inmune del hospedero y del pH ácido presente en el estómago.

Las trans-sialidasas son enzimas vitales para transferir ácido siálico de glicoconjugados del hospedero a las mucinas. Se co-expresan distintas variantes de mucinas y proteínas asociadas a mucinas según el ambiente y circunstancias en las que se encuentra el trypanosoma.

Las glicoproteínas favorecen la unión del parásito a las células (tejidos en mamíferos), enviando y provocando señales en las células que invaden.

La superfamilia GP85/T5 tiene la capacidad de unirse a componentes de la matriz extracelular mediante una región conservada llamada dominio FLY. Este, se une a la citoqueratina 18, promoviendo la desfosforilación y la invasión.

Se han descrito dos ciclos diferentes para la transmisión del parásito, basados en el nicho del vector y hospedero: el ciclo silvestre, que se da entre la vinchuca y animales salvajes; y el ciclo doméstico, entre la vinchuca adaptada a vivir en las viviendas y el humano o animales domésticos. Ambos ciclos se conectan cuando los ratones, ratas o murciélagos infectados y vinchucas migran a regiones deforestadas, donde vive el humano [13].

La vinchuca se infecta mediante la ingesta de sangre de vertebrados infectados. En el estómago del insecto, el parásito se transforma en epimastigota replicativo; luego, en la porción distal del intestino se transforma en tripomastigota metacíclico (forma infectiva que será liberada junto con las heces).

Cuando el insecto se alimenta de la sangre de un mamífero, suele defecar en el mismo lugar. Si es vector del parásito, la forma tripoamastigota metacíclico que se encuentra presente en las heces, es capaz de ingresar al organismo. Esto sucede a través de la propia herida provocada por la picadura, cuando el individuo se rasca o directamente a través de la mucosa que se encuentra debajo de las células. Esta forma metacíclica es capaz de unirse a las células del hospedero mediante la interacción de sus membrana plasmáticas [2, 21-23]. Posteriormente es internalizada en un compartimento membranoso llamado vacuola parasitófora, de la cual son capaces de escapar, y transformarse en amastigotas. Luego de nueve ciclos de división binaria en el citosol, se diferencia en tripomastigota; y mediante la ruptura celular, estas formas parasitarias (denominadas tripomastigotas sanguíneos o derivados de células) son liberadas [2, 24]. Los tripomastigotas derivados de células infectan células vecinas o se

diseminan a través del torrente sanguíneo infectando células localizadas en otras partes del cuerpo.

2.3 Manifestaciones clínicas

La patogenicidad de la enfermedad es muy variable y depende tanto del genotipo del huésped como de la capacidad infectiva del parásito. La sintomatología de la enfermedad de Chagas se divide en dos etapas, una fase inicial o aguda y una fase crónica. La fase inicial de la infección se presenta en muchos casos asintomática, mientras que en otros se presenta con fiebre prolongada, anorexia, náuseas, vómitos y diarrea. Los síntomas aparecen 1-2 semanas luego de la exposición al triatoma infectado y dura entre uno y dos meses. En general, un tratamiento con drogas antiparasitarias durante esta fase cura la infección, y previene las manifestaciones crónicas. Entre un 5-10 % de los pacientes suelen presentar síntomas más severos, como miocarditis o meningoencefalitis que pueden derivar en la muerte. En esta fase, es posible encontrar un alto número de parásitos en la sangre y tejidos; así como niveles altos de citoquinas en el plasma y una intensa activación de linfocitos T CD4⁺ [25] y CD8⁺ [25-27] y linfocitos B [25] (productores de anticuerpos).

En el 90% de los individuos infectados, la fase aguda se resuelve espontáneamente, aún sin haber recibido un tratamiento antiparasitario. Luego de desarrollar inmunidad, la parasitemia y el número de tejidos infectados disminuye, concluyendo la fase aguda.

Alrededor del 60-70% de los pacientes nunca desarrollarán síntomas, por lo que se dice que presentan la forma indeterminada de la enfermedad. El restante 30-40% desarrollará la forma crónica de la enfermedad que se presenta 10-30 años luego de haber sido expuesto al triatoma infectado. Se caracteriza por la presencia de trastornos cardíacos, digestivos o cardiodigestivos que persisten en el individuo por el resto de su vida [28-30]. Si bien durante esta segunda fase casi no es posible encontrar parásitos en sangre, se cree que la reactivación de la enfermedad puede darse por inmunosupresión, particularmente en pacientes con SIDA o en mujeres embarazadas.

En estudios *in vitro*, el parásito es capaz de infectar distintos tipos de células nucleadas, particularmente las células cardíacas [31], del músculo esquelético [32, 33], nervios entéricos [34-36] y adipocitos [37, 38], entre otros.

La cardiopatía severa asociada a la fase crónica es una de las mayores causas de muerte por falla cardíaca en áreas endémicas de Latinoamérica. Se desarrolla en un 20-30% de individuos y se manifiesta con un agrandamiento del corazón, arritmias y aneurismas. Si bien en técnicas histológicas de rutina no se observan parásitos intracelulares, estudios sobre pacientes *post mortem* que padecían la fase crónica de la enfermedad revelaron una inflamación crónica del miocardio, acompañado de mitocitolitis, vasculitis y fibrosis. Se han encontrado una amplia variedad de auto-anticuerpos en estos individuos, incluyendo anticuerpos para antígenos específicos cardíacos, como miocina cardíaca.

La patología digestiva de la fase crónica se desarrolla en un 10-15% de los pacientes y se presenta casi exclusivamente en Argentina, Brasil, Chile y Bolivia.

Aún en infecciones asintomáticas, se ha encontrado una gran cantidad de anticuerpos anti-parásitos. Se cree que la enfermedad de Chagas podría ser el desenlace de un proceso de autoinmunidad luego de varias décadas de infección [36, 39, 40].

2.4 Respuesta celular a la infección por *T. cruzi*

2.4.1 Apoptosis

Los patógenos intracelulares despliegan una gran variedad de estrategias basadas en la habilidad para tomar control de la maquinaria celular y evadir los mecanismos defensivos del hospedero. El éxito en llevar adelante estos procesos les permitirá establecerse y persistir en el hospedero. Un ejemplo de esto es la inhibición de la vía apoptótica celular, lo que le permite al parásito sobrevivir en la célula infectada [41-44].

La apoptosis es el proceso natural de muerte celular programada, en la que están involucrados una gran cantidad de eventos fisiológicos y patológicos. Las células se caracterizan por sufrir una serie de cambios morfológicos. Entre ellos la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la disminución del tamaño celular.

Se ha descrito que *T. cruzi*, al invadir células de mamíferos, se une a un receptor de Tirosin quinasa (TrkA), activando el mecanismo de supervivencia dependiente de TrkA y facilitando su adherencia, invasión y supervivencia [45]. Esta unión está mediada por una trans-sialidasa que se encuentra en la superficie del parásito que es un factor neurotrófico llamado PDNF. Una

vez localizada en el citosol de las células del hospedero, PDNF activaría la vía de señalización Akt, lo que conllevaría a la inhibición de la muerte celular por apoptosis [46]. En particular, las trans-sialidasas de *T. cruzi* se unen a células endoteliales, lo que activa NF- κ B y protege contra la apoptosis [47].

2.4.2 Respuesta inflamatoria

Durante la respuesta inmune innata que se genera inmediatamente luego de la entrada de un agente patógeno al organismo, se sintetizan diversas moléculas localmente, que son transportadas al ganglio. Mediante receptores presentes en la membrana celular (como los receptores tipo Toll) la célula es capaz de identificar la clase de patógeno a la cual se está enfrentando y generar una respuesta específica mediante la síntesis de citoquinas y quimioquinas. Este conjunto de mediadores llevan al ganglio una información particular que es “descifrada” por las células de la respuesta inmune adaptativa que desarrollarán mecanismos efectores adecuados para eliminar el patógeno. Los linfocitos efectores generados en el ganglio son volcados en la sangre a través de la linfa y son capaces de dirigirse al sitio de infección y unirse al endotelio mediante moléculas de adhesión y atravesarlo. De esta manera, los componentes efectores de la inmunidad adaptativa se suman a los de la inmunidad innata para eliminar el patógeno.

La infección por *T. cruzi* es capaz de generar una respuesta pro inflamatoria en el hospedero que parece ser esencial para controlar al parásito. Esta respuesta pro inflamatoria es capaz de generar una respuesta inmune adaptativa, del tipo T dependiente. Si bien los linfocitos T CD8⁺ predominan en la respuesta inflamatoria, también están presentes linfocitos T CD4⁺ y macrófagos[23, 48, 49] que son capaces de dañar el propio tejido del paciente (por ejemplo, el tejido muscular cardíaco).

Las quimioquinas tienen la capacidad de activar y dirigir la migración de leucocitos (quimiotaxis) y participan en diversos procesos fisiológicos, en particular aquellos vinculados a los inflamatorios e inmunitarios. Las quimioquinas y los receptores de quimioquinas son capaces de regular la proliferación de los linfocitos T [50] y la diferenciación de Th1/Th2 [51]. Las quimioquinas son proteínas de bajo peso molecular (8-10 KDa) y se clasifican de acuerdo a la posición relativa de los residuos de cisteína N-terminal. Si dos residuos de cisteína se

encuentran juntos, se denominan quimioquinas -CC, si se encuentran separadas por un aminoácido se denominan quimioquinas -CXC, mientras que si presentan una única cisteína se denominan quimioquina -C. También hay receptores para los distintos tipos de quimioquinas: -CCR, -CXCR y -CR. Estos receptores están relacionados con una súper familia de proteínas de 7 dominios transmembrana [52]. Los niveles de expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas están relacionados con enfermedades infecciosas y autoinmunes. Más aún, los cardiomiocitos sintetizan grandes cantidades de quimioquinas cuando se enfrentan a una invasión por este parásito [53]. Distintas investigaciones [54-59] han presentado evidencias que sugieren que las quimioquinas y los receptores de quimioquinas pueden contribuir al daño del tejido cardíaco en la enfermedad de Chagas.

Algunas moléculas derivadas de *T. cruzi* (como las mucinas y el ADN) estimulan la síntesis de citoquinas y quimioquinas por diferentes tipos celulares (como los macrófagos) [54, 60, 61].

Algunas citoquinas sintetizadas durante una infección por *T. cruzi* (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-1 y TGF- β) son capaces de estimular o regular a macrófagos y cardiomiocitos en la síntesis de quimioquinas [53, 62]. En particular, la quimioquina CCL2 potencia la habilidad de los macrófagos y cardiomiocitos para eliminar a *T. cruzi*. [53, 60]. Más aún, *in vitro* se ha observado que las quimioquinas son capaces de estimular a los cardiomiocitos y a los macrófagos de forma autócrina, los que liberan NO y eliminan el parásito.

A su vez, las quimioquinas estimulan a los macrófagos para sintetizar la citoquina TNF- α , la cual actúa en conjunto con IFN- γ para matar al parásito [60].

Las citoquinas son proteínas que también regulan la proliferación de las células que las producen y las de otros tipos celulares, así como la diferenciación, quimiotaxis, crecimiento, entre otros. Son producidos fundamentalmente por leucocitos y macrófagos.

Frente a una respuesta contra *T. cruzi* se genera una respuesta tipo Th1, sintetizándose diversas citoquinas como IFN- γ , TNF- α , e IL-12, que controlan la replicación e infección ([63, 64]. Al igual que lo que sucede con la síntesis de quimioquinas, cuando ingresa el parásito al organismo, determinadas moléculas como mucinas y ADN estimulan su producción. Los macrófagos sintetizan TNF- α e IL-12 [65], este último estimula las células Natural Killer (NK) para la síntesis de IFN- γ , que a su vez estimula positivamente la síntesis de IL-12. La producción de IFN- γ es a su vez aumentada por los macrófagos quienes se encuentran

estimulados positivamente por TNF- α y IL-1 β . Estas citoquinas generan una respuesta tipo 1 de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que producen IFN- β (necesario para inducir y mantener una respuesta en una infección aguda).

Una acción en conjunto de quimioquinas y citoquinas actúa como mediadora entre la respuesta inmune innata y adaptativa para controlar y eliminar al *T. cruzi*.

2.4.3 Reorganización del citoesqueleto

Como se mencionó anteriormente la forma infectiva del parásito ingresa a las células del hospedero, se une a la membrana e induce la formación una vacuola parasitófora.

Se ha demostrado que la entrada de *T. cruzi* involucra el reclutamiento y la fusión de lisosomas del hospedero en el sitio de invasión [66].

Las células presentan una red de actina dispuesto de forma paralela a la membrana interna. La de-polimerización de la actina es un proceso mediado por el calcio, y se cree que facilitaría la entrada del parásito a la célula [66-68]. El rol de la polimerización de la actina dependería del tipo celular y del estadio del parásito [69].

También se ha observado que durante las primeras etapas de la invasión de células HeLa y otros tipos celulares, se forman protrusiones celulares [70] o pseudópodos [71]. En un estudio reciente realizado por Fernandes y colaboradores [72], se demostró que estos tripomastigotas que forman protrusiones desde la célula del hospedero y se encuentran asociados a filamentos de actina. Los resultados indican que esta estructura derivaría del citoesqueleto cortical que se encuentra deformado por la movilidad activa del parásito.

2.4.4 Receptores Tipo Toll

El reconocimiento inicial de la presencia de un agente patógeno es llevado adelante por receptores tipo Toll (TLRs), una familia de receptores transmembrana Tipo I que presentan un dominio Toll/IL1 intracelular que inicia la vía de señalización, afectando la actividad de la célula. El dominio N-terminal se encuentra en la región extracelular y presenta repetidos ricos en Leucina [73]. Este dominio es capaz de reconocer una amplia variedad de motivos estructurales (patrones moleculares asociados al patógeno o PAMPs) como lípidos,

carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas derivadas de virus, bacterias, hongos, protozoarios, entre otros. Estos receptores también pueden ser activados por señales provenientes del propio tejido endógeno dañado (DAMPs).

Existen varios TLRs conocidos, que son expresados en humanos (TLR1-10) y cada uno es capaz de reconocer distintos tipos de estructuras químicas altamente conservadas en microorganismos. Una vez que se unen los ligandos, el receptor se dimeriza (homodímero o heterodímero) y recluta moléculas de señalización, que luego inducen distintas vías que propagan la señal y que promueven la transcripción de genes de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y moléculas coestimuladoras que vinculan la respuesta inmune innata con la adaptativa [74]. Entre las moléculas adaptadoras involucradas en esta vía de señalización se encuentra: MyD88, Tirap, Trif y Tram. La vía de señalización puede dividirse en dos: dependiente de MyD88 y dependiente de Trif.

La vía de señalización dependiente de MyD88 es utilizada por todos los TLRs excepto TLR3. Como efecto primario se encuentra la activación de NFkB y una MAP quinasa (Mitogen-Activated Protein kinase). Una vez que se une el ligando al TLR, se genera un cambio conformacional que desencadena el reclutamiento de MyD88. Este recluta a diversas proteínas y se genera una cascada de fosforilación, activando la expresión de genes que producen citoquinas pro-inflamatorias.

Por otro lado, la vía de señalización dependiente de Trif es utilizada por TLR3 y TLR4 y son desencadenadas por ARN de doble cadena y lipopolisacáridos respectivamente. La activación de TLR producen el interferón tipo I y NFkB (de la misma manera que lo genera la vía dependiente de MyD88).

La superficie celular del parásito *T. cruzi* contiene una amplia variedad de glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), que presentan anclajes glicosilfosfatidilinositol (GPI) para glicoproteínas o polisacáridos o GIPLs libres que contienen un core estructural idéntico a GPI [75, 76]. Las secuencias de oligosacáridos y lípidos estructurales de la gran mayoría de GIPLs purificados de distintas cepas de *T. cruzi* muestran una gran heterogeneidad en la composición de glicanos y lípidos de GIPLs. Esto se ha observado tanto en parásitos de distintas cepas como dentro de la misma cepa [77-79]. Los anclajes GPI purificado de *T. cruzi* desencadenan una respuesta dependiente de TLR2 [80], aumentando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en tanto los GIPLs involucran una vía de señalización dependiente de TLR4 [81].

TLR2 forma heterodímeros con TLR1 o TLR6 y cada dímero presenta una especificidad por ligandos diferente. Si bien esta vía de señalización es muy importante, mediante un estudio realizado en ratones que carecían de TLR2 se pudo comprobar que aún en ausencia de este tipo de receptor, no se observaba ningún cambio en cuanto a la parasitemia y muerte de los ratones [82]. Este resultado indicaría que además del TLR2, habría otro receptor implicado en la activación de la respuesta inmune innata. Sin embargo, ratones nulos de MyD88 son más susceptibles a la infección por *T. cruzi* [82]. A partir de esto, Oliveira y colaboradores propusieron que la expresión de TLR4, sería necesaria para generar una respuesta *in vivo* proinflamatoria y una activación *in vitro* de NF- κ B [81]. Recientemente se ha reportado que TLR9 actúa junto a TLR2 para controlar la replicación del parásito, más aún, que TLR9 cumple un papel central en la inducción de la síntesis de IL-12/IFN- γ dependiente de MyD88 durante la infección de *T. cruzi* [83]. Por otro lado, ratones deficientes de TLR2 y TLR9 no mostraron la mortalidad aguda observada en ratones deficientes de MyD88. Posiblemente otro receptor de esta familia podría estar involucrado. Los ratones que carecían tanto de MyD88 y de la molécula adaptadora Trif (activada por TLR3 y TLR4) mostraron ser más susceptibles que aquellos que carecían solamente de MyD88. Estos ratones fueron incapaces de controlar la parasitemia y murieron poco tiempo luego de la infección[84]. Los receptores TLR3 y TLR4 que activan la vía dependiente de Trif sería indispensable para la producción de interferón tipo I.

A su vez, otro estudio en ratones nulos de TLR3, reveló que no había fundamentos para creer que TLR3 promovía control en la parasitemia de *T. cruzi* o en la supervivencia del hospedero [85](aunque quizás TLR3 actúa de manera cooperativa con otro receptor, como lo hacen TLR2 y TLR9). En este estudio también postulan a TLR7 como receptor clave en el reconocimiento de ARN de este parásito

Por último, en un estudio publicado por Chessler y colaboradores postularon que la producción de Interferón tipo I generada como respuesta a una infección por *T. cruzi*, era dispensable de los adaptadores MyD88 y Trif, así como TLR4 y TLR3. Demostraron que este parásito es capaz de generar una expresión de interferón β de manera independiente de TLRs [86].

Estos resultados indicarían que el reconocimiento y entrada de este parásito en las células del hospedero sucedería por más de una vía.

2.5 Microarreglos de expresión

Es una técnica que permite el estudio de la expresión de varios genes en un mismo ensayo. Se desarrolló a partir del *dot blotting*, una aplicación del *southern blotting* [87]. Esta técnica consiste en colocar pequeños fragmentos de ADN en una membrana de nitrocelulosa o nylon, para luego hibridarlo con una sonda de ADN marcada radiactivamente. El resultado se visualizaba mediante radiografía de rayos X.

Posteriormente se desarrollaron los macroarreglos con el fin de aumentar la cantidad de diferentes sondas que podían utilizarse al mismo tiempo y a diferencia del *dot blotting*, las sondas y no el blanco eran colocados en la membrana. Las sondas necesitaban estar espaciadas por 50 -250 μm una de otra, por lo que el desarrollo de los microarreglos permitió el posicionamiento de una mayor cantidad de sondas marcadas en sustrato de vidrio o silicona [88].

Los microarreglos han sido utilizados para estudiar perfiles de expresión génicas [89, 91], polimorfismo de un único nucleótido [89], entre otros. Como ventaja podría señalarse que es posible estudiar la expresión de varios genes en un mismo ensayo y que es una técnica sencilla en la que se obtiene resultados rápidamente.

Si bien es una técnica muy útil, que permite minimizar el tiempo de trabajo al estudiar varias partes del genoma a la vez, permite estudiar únicamente las variantes del gen que se encuentra en el microarreglo y que se encuentran anotadas, lo que podría llevar a falsos resultados o ver resultados de forma parcial. A su vez, permite estudiar re-arreglos desbalanceados (duplicaciones y deleciones) y no translocaciones balanceadas o inversiones.

2.6 Significance Analysis of Microarrays (SAM)

Es una técnica estadística que permite identificar genes diferencialmente expresados mediante la realización de t-test de genes específicos y calcular un valor estadístico $d(i)$ para cada gen i . El valor estadístico $d(i)$ mide la fuerza de la relación entre la expresión génica y una variable de respuesta. [90]. Este tipo de análisis utiliza estadísticas del tipo no paramétricas ya que los datos pueden no seguir una distribución normal. A cada gen se le asigna un valor de

calificación de acuerdo sus niveles de expresión relativa a la desviación estándar de medidas repetidas para ese gen. Los genes cuyo valor de calificación es mayor al umbral fijado por el usuario, son considerados potencialmente significativos. El valor de FDR (*False discovery rate*) corresponde al porcentaje de genes que han sido identificados como diferencialmente significativos por mero azar, y para estimar este valor, se realizan permutaciones de las medidas (lo que evita asunciones paramétricas sobre la distribución de los datos).

Para considerar las fluctuaciones específicas de los genes, Tusher y colaboradores define una estadística basada en la relación de cambio en la expresión génica con respecto a la desviación estándar para ese gen. La diferencia relativa $d(i)$ en la expresión génica es:

$$d(i) = \frac{\bar{x}_I(i) - \bar{x}_U(i)}{s(i) + s_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde $x_{I(i)}$ y $x_{U(i)}$ se definen como los niveles de expresión promedio para el gen (i) en los estados I y U, $s(i)$ es la desviación estándar de medidas repetidas de expresión:

$$s(i) = \sqrt{a \left\{ \sum_m [x_m(i) - \bar{x}_I(i)]^2 + \sum_n [x_n(i) - \bar{x}_U(i)]^2 \right\}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Los parámetros $\sum_m$ y $\sum_n$ son sumatorias de las medidas de expresión en los estados I y U respectivamente: $a = (1/n_1 + 1/n_2) / (n_1 + n_2 - 2)$

n_1 y n_2 son los números de medidas en el estado I y U respectivamente.

El valor de s_0 es elegido como aquel que minimiza el coeficiente de variación de la estadística $d(i)$, y este es llamado “valor d observado”. Para determinar $d(i)$, SAM estima el “valor d esperado” si no hubiera diferencias entre los dos estados. Esto se realiza permutando o cambiando azarosamente, el marcado de clases sin cambiar los datos y recalculando el valor de SAM para cada juego de sonda. Luego de un largo número de permutaciones, el resultado estima el valor que se obtendría si la diferencia en la expresión de los genes fuera al azar.

La diferencia de expresión génica observada puede ser estimada comparando los valores d “observados” y “esperados”. El usuario puede definir un umbral basado en el *Fold change (F.C.)* y el valor delta (que define un umbral para los valores falsos positivos) para seleccionar genes para los que el “valor observado d ” es mayor (significativamente positivos) o es menor

(significativamente negativos) que el delta. Si el delta es mayor, el rigor de los resultados aumenta y el valor de FDR se vuelve menor. Para cada valor de delta, el *output* de SAM consiste en una lista de genes o sondas con un FDR asociado. El FDR se estima a partir de la distribución de los valores observados y esperados. No existe un criterio de recomendación para elegir un valor de delta en SAM. El número de genes significativos elegidos por SAM depende de la elección del delta y éste debe ser seleccionado manualmente.

Dentro de SAM que ofrece el programa MeV, existen distintos tipos de test:

- Dos clases, no pareados: las muestras caen dentro de uno de los dos grupos (A o B) y los sujetos son considerados diferentes entre cada grupo. Los genes son significativos positivos si la expresión media en el grupo B es significativamente mayor que en el grupo A; y son significativos negativos si la media de expresión en el grupo A excede significativamente el grupo B.
- Dos clases pareados: las muestras no solo son asignadas a dos grupos, sino que además son pareadas uno a uno entre el grupo A y B.
- Múltiples clases: el usuario especifica el número de grupos (>2) en los que se dividen las muestras. Los genes son considerados significativos si en la combinación de algunos, presentan una expresión significativamente diferente.
- Sensor de supervivencia: cada muestra se asocia a un tiempo y un estado.
- Una clase: el usuario especifica un valor contra el cual la media de expresión de cada gen es testeada. Un gen es considerado significativo si su ratio de expresión media log2 de todas las muestras incluidas es significativamente diferente de la media especificada por el usuario.

RESULTADOS PRELIMINARES

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

En este proyecto se trabajó con datos de microarreglos de expresión, generados previamente por la Mag. María Laura Chiribao, en el marco de su tesis doctoral, en un modelo de infección de células HeLa, y analizados con el programa GeneSpring.

Esta tesis tiene como objetivo central evaluar la respuesta celular humana frente a la invasión de *Trypanosoma cruzi* en células HeLa (como modelo de célula no fagocítica profesional), con el programa *Multiexperiment Viewer*, con el fin de identificar genes y vías celulares que se encuentran implicados en la entrada del parásito a la célula.

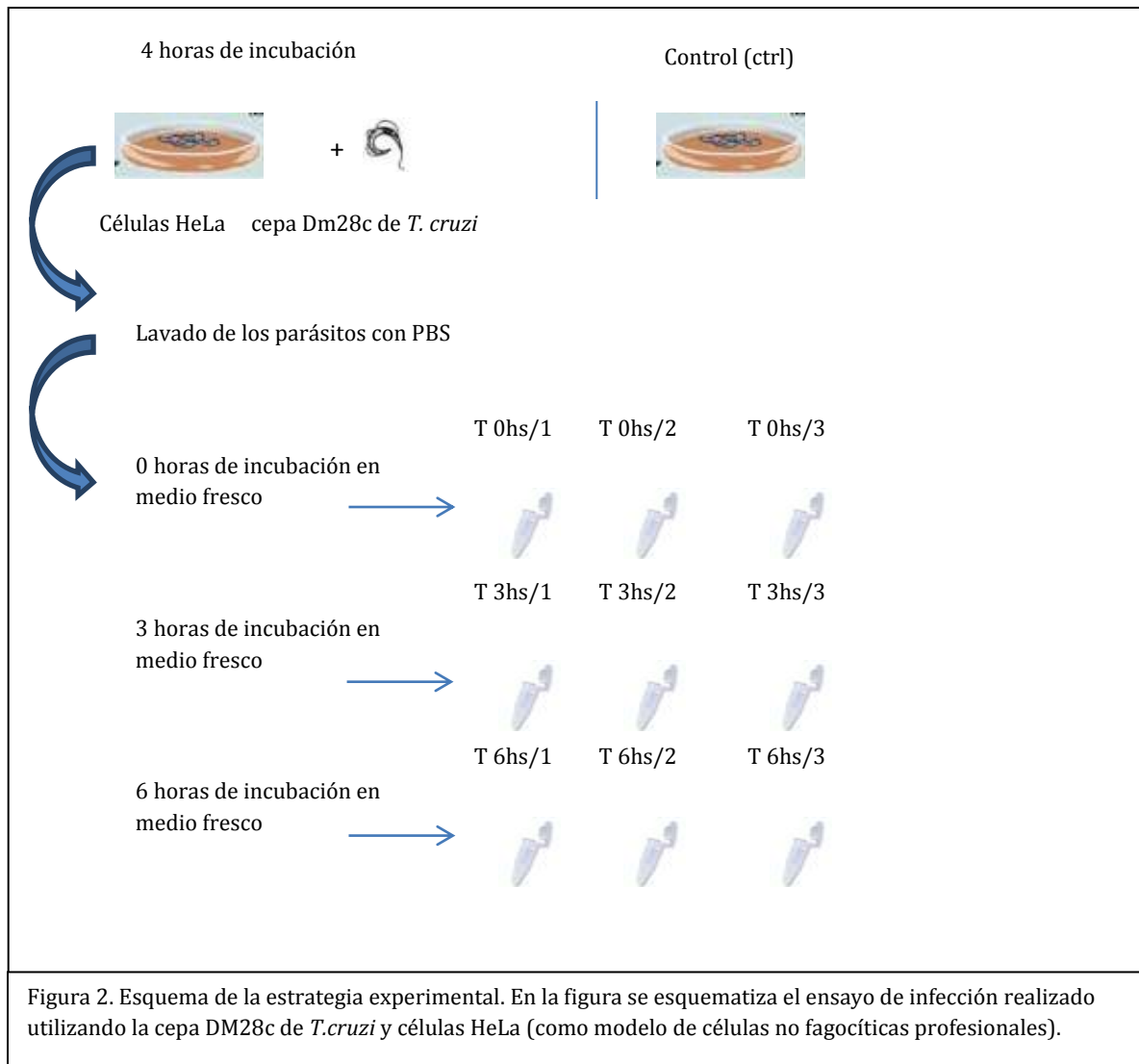
3.2 Objetivos específicos

- Utilizar el *software* libre *Multiexperiment Viewer* (MeV) para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos de la técnica de Microarreglos, evaluar su alcance y utilidad.
- Estudiar la ontología de los genes diferencialmente expresados con respecto al control, centrándonos en las vías de apoptosis, Respuesta inflamatoria, reorganización del citoesqueleto y receptores tipo Toll.
- Validar los resultados de microarreglos mediante RT-PCR en tiempo real.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Infección de células HeLa.

Los experimentos de co-cultivos que se describen a continuación fueron realizados en la Unidad de Biología Molecular por la Mag. María Laura Chiribao. Las líneas celulares fueron



mantenidas en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino. Las células seleccionadas como modelo de no fagocíticas profesionales fueron las HeLa, y la cepa de *Trypanosoma cruzi* fue DM28c (tripomastigota sanguíneo). Esta última es un clon obtenido *in vitro* de la cepa DM28 y es capaz de atravesar por todos los estadios de vida mencionados (estadios de vida del parásito *in vivo*).

En este ensayo, se utilizaron placas de 6 *wells* y se disminuyó la concentración del suero al 2%, de modo de disminuir la cantidad de proteínas interactuando y de enlentecer la velocidad de crecimiento celular. Se incubaron células a un 70% de confluencia y los parásitos durante 4 horas, a 37 °C en atmósfera húmeda, y 5% de CO₂. Paralelamente, se incubaron las mismas células en iguales condiciones pero sin parásitos, a modo de control. Transcurrido el tiempo de infección las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 0, 3 y 6 horas en iguales condiciones, pero en medio fresco. Se realizaron tres réplicas biológicas de cada uno de los tiempos, así como del control (figura 2).

Las primeras 4 horas de incubación serían necesarias para que los parásitos se aproximen a las células HeLa. Los posteriores tiempos de incubación fueron seleccionados para estudiar el proceso de adhesión parásito-célula (0hs), ingreso del parásito mediante la vacuola parasitófora (3hs) y salida del parásito al citoplasma celular (6hs). Las extracciones de ARN se realizaron mediante el protocolo de *Trizol Reagent* de Invitrogen (USA), y la cantidad y calidad de ARN mediante Nanodrop y Bioanalyzer (Agilent) respectivamente.

4.2 Técnica de Microarreglos.

La Unidad de Biología Molecular cuenta con la plataforma de Agilent para realizar microarreglos. Se trabajó con la técnica de microarreglos de un color de acuerdo al protocolo de Agilent Technologies (*One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Low Input Quick Amp Labeling* de Agilent Technologies). Brevemente, se prepararon las distintas mezclas a utilizar para el marcado del ARN con cianina 3 (Cy3) según indicaciones del fabricante, y se procedió con el marcado, purificación y amplificación del ARN según protocolo (figura 3). Luego se prepararon las muestras para la hibridación, y posteriormente para el ensamblado e hibridación utilizando la sonda *Whole Human Genome Microarray Kit 4X 44K* (tabla 1) de Agilent Technologies. Se incubaron a 65°C durante 17 hs y se lavaron los microarreglos. Se obtuvo el perfil específico de la página de Agilent para el microarreglo: Human Genome Oligo 4X 44K (<https://www.genomics.agilent.com/GenericA.aspx?PageType=Custom&SubPageType=Custom&PageID=2074>). Se determinaron los parámetros del escaneo (canal del colorante: verde; región de escaneo: 61 x 21.6 mm; resolución de escaneo: 5 µm; Tiff: 16 bits) y se evaluó de la calidad del ensayo. Las imágenes escaneadas se convirtieron en señal de intensidad utilizando

el programa de extracción de datos que provee la plataforma Agilent Technologies (*Feature Extraction Software*).

Propiedades		Características	
Número de producto de Agilent	de	G4112F	
Identificación de diseño	de	014850	
Formato		4 x 44K	
<i>Slides</i>		4	
Propiedades biológicas		Target	19,596
		Entrez RNAs	Gene
Réplicas de sondas biológicas		264 x 10	
Controles positivos		10 x 32	E1A
		spike- in control probes	

Tabla 1. Especificaciones del microarreglo utilizado para el ensayo.

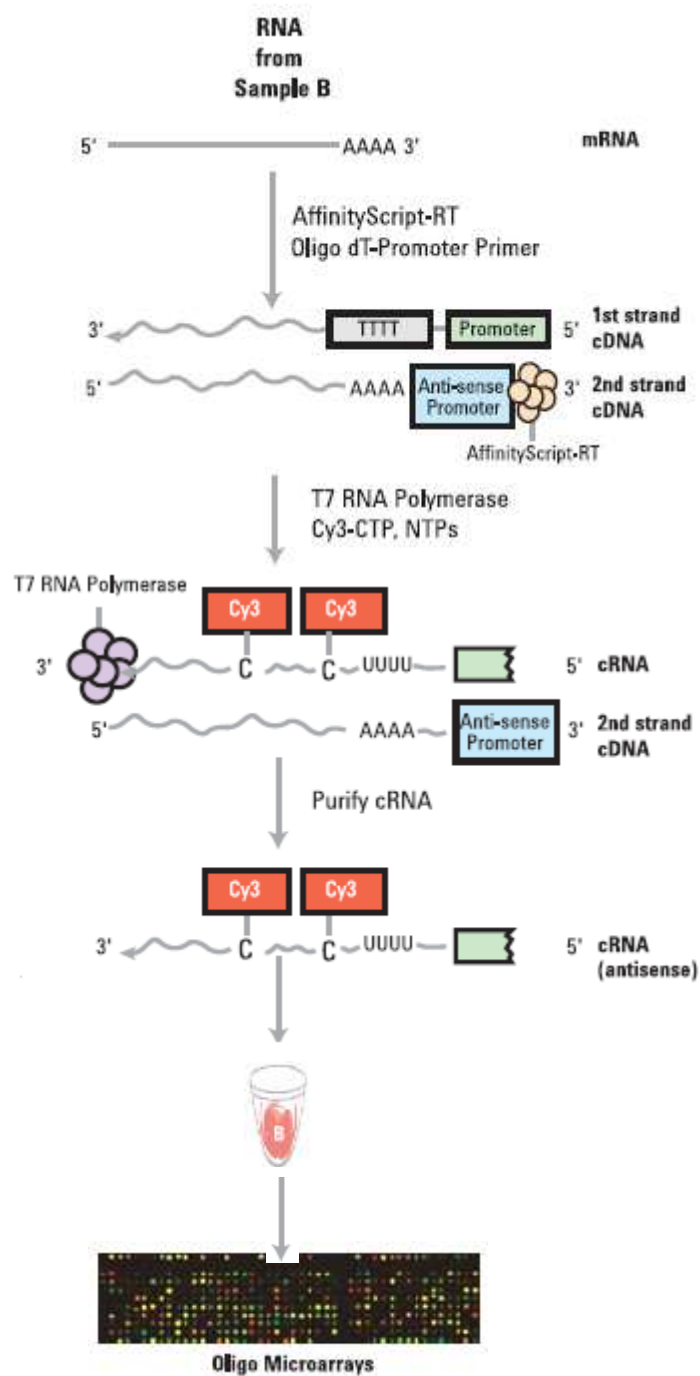
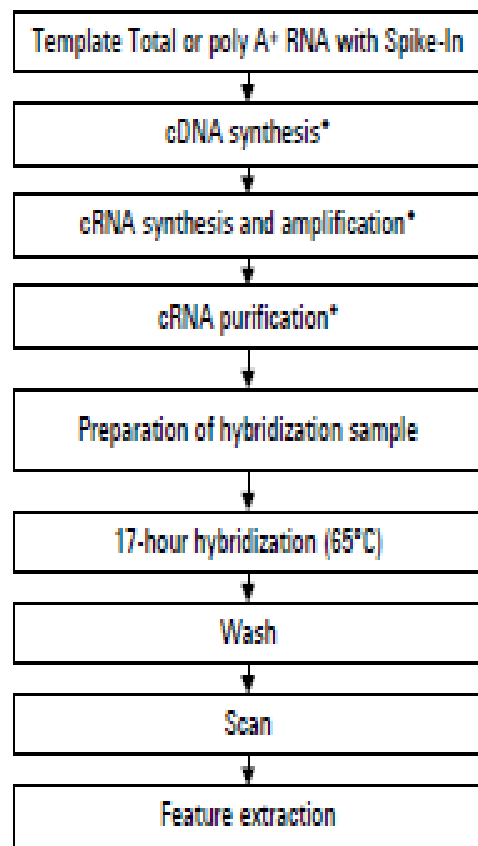


Figura 3. Esquema del protocolo de la técnica de microarreglos del manual de *Agilent Technologies- One color Microarray-Based gene expression Analysis*.

4.3 Identificación de genes diferencialmente expresados.

Los perfiles de expresión de los experimentos a distinto tiempo se normalizaron en el paquete *Agi4x44PreProcess* (*Bioconductor*), en el *software* R.

Utilizando este *software*, se evaluó la calidad de los resultados del ensayo de Microarreglos mediante un análisis de componentes principales. Esto permitió identificar patrones en un conjunto de datos y presentarlos de manera tal que resaltaran sus diferencias y similitudes.

Posteriormente, se analizaron los datos utilizando el *software* libre MeV v4.8 (licencia artística 2.0) mediante un test de dos clases no pareados de *Significance Analysis of microarray* (SAM). En este test, las réplicas de un mismo tiempo caen dentro de uno de los dos grupos evaluados y los tiempos comparados son diferentes entre ambos grupos. Se seleccionaron las tres réplicas no infectadas (control) como grupo A (en los tres análisis) y las tres réplicas de tiempo 0 horas de infección como grupo B para el primer análisis; las tres réplicas de tiempo 3 horas como grupo B para el segundo análisis; y las tres réplicas de tiempo 6 horas para el tercer análisis.

De acuerdo al manual del programa, el test considera que un gen se encuentra sobre-expresado significativamente si la expresión media del grupo B es significativamente mayor a la media de expresión del grupo A; mientras que un gen se encuentra sub-expresado significativamente en caso inverso. Se manejaron los datos faltantes con el método “k-nearest neighbour”, en donde los “K” genes más similares (usando distancias Euclidianas) al gen faltante fueron utilizados para la entrada del valor faltante. En los tres casos se determinó un número de permutaciones de 500, y se seleccionó la opción de cálculo del valor q (es el menor valor de FDR para el cual un gen es asignado como significativo [91]). A partir de cada análisis se obtuvo un gráfico interactivo (basado en la permutación de los datos) de los valores-d observados versus los esperados. En este gráfico se determinó un valor de delta tal que el valor de FDR fuese menor a 0.001% (de cada mil genes determinados como significativos solamente uno correspondería a un falso significativo) y un umbral de *fold change* (F.C.) de 2,0.

Por último se trabajó con las listas de genes diferencialmente expresados manualmente de manera de obtener una lista de genes únicos, sin duplicados ni genes no caracterizados.

Utilizando el *software* R (*Bioconductor*) se verificó que la lista de genes únicos obtenida manualmente fuera correcta.

4.4 Estudio de ontología de genes diferencialmente expresados con respecto al control.

Mediante la colaboración de la Unidad de bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo se realizó un análisis de ontología de genes a partir de la lista obtenida. Se utilizó el software R (*Bioconductor*) y la base de datos disponible en www.geneontology.org.

Se analizó cada condición experimental de forma independiente (los genes significativos a las 0hs, 3hs y 6hs de incubación con el *T. cruzi*) y se fijó un umbral de p-valor ajustado $\leq 0,05$.

Un análisis de ontología de genes en base a los procesos biológicos brinda información sobre los procesos biológicos en los que los genes se encuentran involucrados. Un proceso biológico es una serie de eventos realizados por uno o más conjuntos ordenados de funciones moleculares. Este tipo de análisis describe el comportamiento de los productos génicos en un contexto celular.

Se realizó un análisis de ontología de genes resumido (*Gene ontology Slim*) que brinda una visión general sin el detalle específico de los términos; y un estudio más detallado centrado en la vía de la respuesta inmune e inflamación, apoptosis, receptores del tipo Toll y reorganización del citoesqueleto.

4.5 Validación de la técnica de microarreglos mediante RT-PCR en tiempo real.

Se seleccionaron genes a partir de la lista obtenida para la validación mediante qRT-PCR.

➤ Síntesis de ADN copia (ADNc)

Se extrajo el ARN y se sintetizó ADNc para posteriormente amplificar las secuencias de genes de interés mediante qPCR. Se partió de 500 ng de ARN y se utilizó el kit de Invitrogen (USA) SuperScript™ III Reverse Transcriptase de acuerdo al protocolo del fabricante.

➤ Diseño de cebadores

A partir de la base de datos del NCBI se obtuvieron las secuencias de los genes de interés y se diseñaron los cebadores utilizando el programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se seleccionaron oligonucleótidos en posiciones cercanas a la región de interés y de secuencias conservadas. Para cada oligonucleótido el largo de la secuencia fue entre 19 y 22 nucleótidos, con una composición de

bases G-C entre el 40 y 60% y una temperatura de *melting* (T_m) con una diferencia de hasta 5°C entre pares de oligonucleótidos (tabla A1 del anexo). Al diseñarlos se consideró que cada par de cebadores se encontrara en exones diferentes; esto permite la identificación de contaminación de la muestra con ADN dado que el genoma eucariota se caracteriza por presentar en su secuencia tanto exones como intrones. A diferencia del ARN mensajero que sufre el proceso de empalme donde se eliminan los intrones. Por lo que si la muestra de ARN presentara contaminación con ADN los fragmentos amplificados en la qPCR serían de mayor longitud que los de ARN. También se consideró que no se formaran bucles, ni dímeros de cebadores.

➤ **PCR en tiempo real**

Los ensayos de qPCR se realizaron con *KAPA™ SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal*, de Kapabiosystems (USA). Como control endógeno se utilizó GAPDH [92, 93]. Se trabajó con tres réplicas biológicas de cada una de las condiciones experimentales (0, 3 y 6 hs de incubación de células HeLa con *T.cruzi*) y por duplicado. Se utilizó una dilución 1/5 del ADNc, 200 nM de cada cebador, 5 µL de mezcla KAPA™ SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal y agua libre de ARNasas para completar un volumen final de 10 µL. Se colocaron en el equipo Rotor Gene 3000 (Corbett research) y se realizaron 40 ciclos: 15 segundos a 95°C (desnaturalización), 30 segundos a 57°C (*annealing*) y 30 segundos a 72°C (extensión). Se estudiaron los gráficos de cuantificación y de fusión para evaluar su calidad. Se seleccionó la opción de corrección de pendiente, se determinó un valor de *threshold* de 0,05 y se obtuvieron los valores de Ct para cada gen y muestra. Se calcularon los valores de expresión relativa para cada gen, tomando una eficiencia del 100%, de acuerdo a la ecuación 3 [91, 94]:

$$\text{Expresión relativa} = [E (\text{gen de interés})^{\Delta CP_{\text{gen de interés}}(\text{control-muestra})} / E (\text{ref})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control-muestra})}]$$

Siendo E (gen de interés) la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de interés; E (ref) la eficiencia de la PCR en tiempo real del gen de referencia (GAPDH); $\Delta CP_{\text{gen de interés}}$ es la diferencia entre el Ct del control y el Ct de la muestra del gen de interés; el ΔCP_{ref} corresponde a la diferencia entre el Ct del control y el Ct de la muestra de referencia (GAPDH).

5. RESULTADOS

5.1 Técnica de Microarreglos.

Se cuantificó el ARN luego de la purificación del marcado con Cy3 y amplificación utilizando el equipo NanoDrop 1000 de Thermo Scientific. En la tabla 2 se presentan los valores de la concentración de Cy3, concentración de ARN amplificado y Abs 260/280. A partir de estos datos, se realizó el cálculo de rendimiento y de la actividad específica de cada reacción según el protocolo proporcionado por Agilent Technologies.

Muestra	Fluoróforo	Concentración de Fluoróforo (pmol/ μ L)	Concentración ARN copia (pmol/ μ L)	Abs 260/280	rendimiento (μ g)	Actividad específica (pmol Cy3/ μ g de ARNc)
Control 1	Cy3	12,40	209,98	2,20	8,40	59,05
Control 2	Cy3	7,56	146,67	2,24	5,87	51,54
Control 3	Cy3	5,26	112,93	2,29	4,52	46,58
t 0hs/1	Cy3	10,73	201,16	2,23	8,04	53,34
t 0hs/2	Cy3	14,45	229,70	2,20	9,19	62,91
t 0hs/3	Cy3	14,31	223,36	2,24	8,93	64,07
t 3hs/1	Cy3	15,07	221,95	2,22	8,88	67,90
t 3hs/2	Cy3	15,13	225,11	2,17	9,00	67,21
t 3hs/3	Cy3	15,21	218,79	2,18	8,75	65,52
t 6hs/1	Cy3	11,47	187,08	2,21	7,48	61,33
t 6hs/2	Cy3	9,41	160,12	2,22	6,40	58,77
t 6hs/3	Cy3	13,17	207,63	2,20	8,30	63,43

Tabla 2. Valores de rendimiento y actividad específica, calculados a partir de la concentración de fluoróforo y Abs 260/280.

Los valores de rendimiento calculados fueron mayores a 1.65 (valor de rendimiento mínimo recomendado por el fabricante para los microarreglos utilizados) y los valores de actividad específica (pmol de Cy3 por μ g de ARN copia) calculados fueron mayores a 6 (valor de actividad específica recomendada por el fabricante). Se prosiguió con la hibridación y lavados de acuerdo al protocolo del fabricante. Luego del escaneo de los Microarreglos se obtuvo una imagen similar a la figura 4.

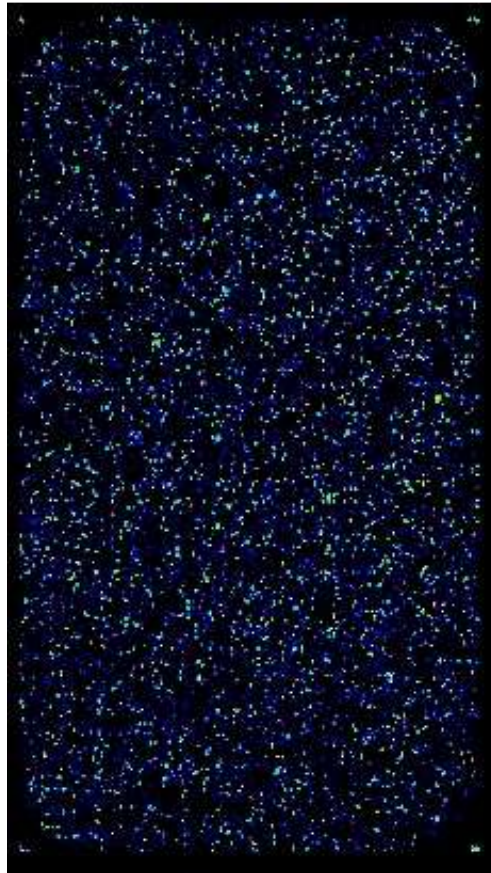


Figura 4. Imagen obtenida luego de realizar el escáner de microarreglos de un solo color, utilizando el canal verde.

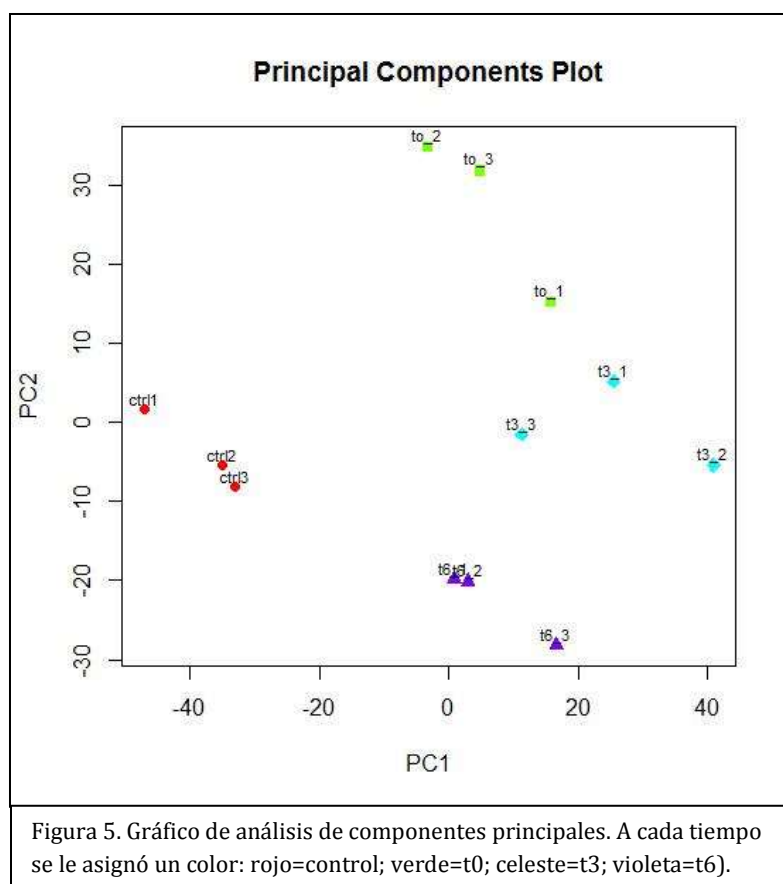
5.2 Evaluación de la calidad del microarreglo y de las réplicas biológicas

➤ Reporte de control de calidad de Agilent

Al observar los distintos datos que presenta el reporte, se concluye que la calidad del microarreglo es adecuada para continuar con el análisis (sección A2 del anexo).

➤ Análisis de componentes principales

Es una técnica desarrollada por Pearson a finales del siglo XIX y es utilizada para reducir la dimensionalidad o número de variable de un conjunto de datos, con la menor pérdida de información posible. Para estudiar las relaciones que se presentan entre p variables correlacionadas, se puede transformar el conjunto original de variables en otro conjunto de nuevas variables que no tengan dependencia lineal entre sí (no correlacionadas), llamado componentes principales. Estas nuevas variables son combinaciones lineales de las originales, independientes entre sí, y se construyen en base a un orden de importancia de acuerdo a la variabilidad total que recogen de la muestra. Es decir, el primer componente contiene la



mayor varianza, el segundo componente explica menor varianza que el primero, y así sucesivamente.

A partir del análisis de componentes principales realizado sobre las intensidades de fluorescencia emitida en cada réplica biológicas, se obtuvo un gráfico de componentes principales. Cada réplica se encuentra representada por un único punto y a cada tiempo se le asignó un color diferente (figura 5).

Al analizar el gráfico de la figura 5 de forma global se observa que las réplicas correspondientes al control se encuentran en el cuadrante izquierdo del componente principal 1, mientras que las restantes réplicas de los demás tiempos se distribuyen en el cuadrante derecho. Esto indicaría un comportamiento diferente entre el control y los restantes tiempos. A su vez, las réplicas de cada condición se encuentran cercanas entre sí y a cierta distancia de las demás condiciones (figura 5). Cuanto más próximo se encuentran los puntos entre sí, menor variabilidad presentan. Esto indicaría que las réplicas de una misma condición presentan menor variabilidad entre sí que entre las distintas condiciones.

Al analizar las réplicas de cada condición se observa que aquellas correspondientes al control y al tiempo 6hs presentan menor variabilidad que el tiempo cero y tres. En el primer caso, las réplicas se encuentran muy cercanas entre sí, mientras que en el segundo se encuentran más alejadas (y a su vez, las réplicas del tiempo 3hs se encuentran más alejadas que las de 0hs de incubación con el parásito). Dado que el control no ha sido incubado con el parásito, es de esperar que las réplicas presenten menor variabilidad entre sí. De acuerdo a la distribución del gráfico (figura 5), la variabilidad entre las réplicas aumentaría al incubarse las células con el parásito durante 0hs y 3hs, y luego disminuiría nuevamente. Cabe destacar que si bien las réplicas del tiempo 6hs de incubación y control presentarían menor variabilidad que las restantes, estas no se distribuyen de igual forma en el gráfico. Los tres puntos del control se encuentran cercanas al eje 0 del componente 2, mientras que los tres puntos del tiempo 6hs se encuentran cercanos al eje 0 del componente 1 (al igual que el tiempo 0hs y 3hs).

Mediante este análisis se concluye que la calidad de las réplicas biológicas de cada tiempo de infección con el parásito es óptima y tiene sentido continuar el análisis.

5.3 Identificación de los genes que presentan una expresión diferencial significativa con respecto al control.

Se realizaron tres SAM (0hs, 3hs, y 6hs) independientes entre sí a partir de los cuales se obtuvo una tabla delta (en la cual se verificó que el valor delta asignado al ensayo correspondiera con un valor de $FDR < 0.001$), tablas de genes significativos y gráficos de perfil de expresión (*Heatmaps*).

Antes de comenzar a trabajar con los resultados, se observó el diagrama de perfil de expresión general y se modificó el rango de color para no visualizar saturación. En la figura 6 se observa parte del perfil de expresión obtenido, en color verde se representan los genes sub-expresados y en rojo los genes sobre-expresados con respecto al control. En el lateral derecho se encuentran los nombres de las sondas representadas (*gene ID*). Solamente se muestra una imagen parcial del *Heatmap* que se obtiene en el MeV ya que el programa no permite guardar imágenes en donde se encuentren todos los genes.

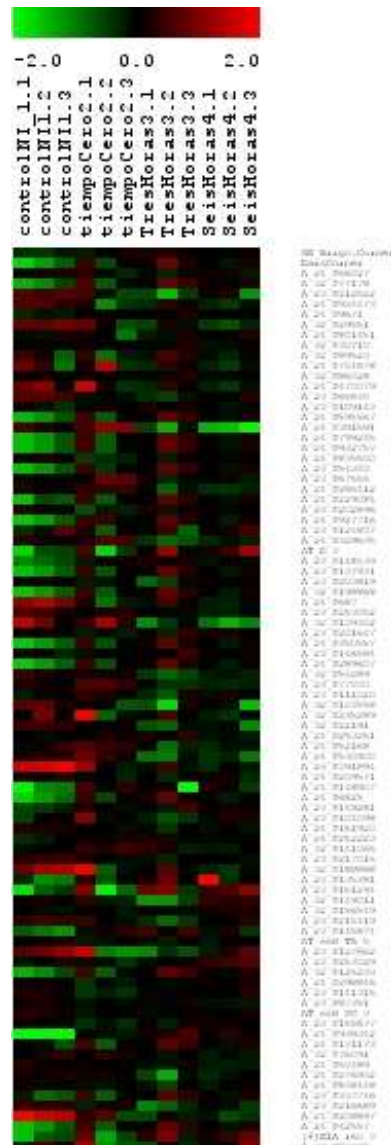
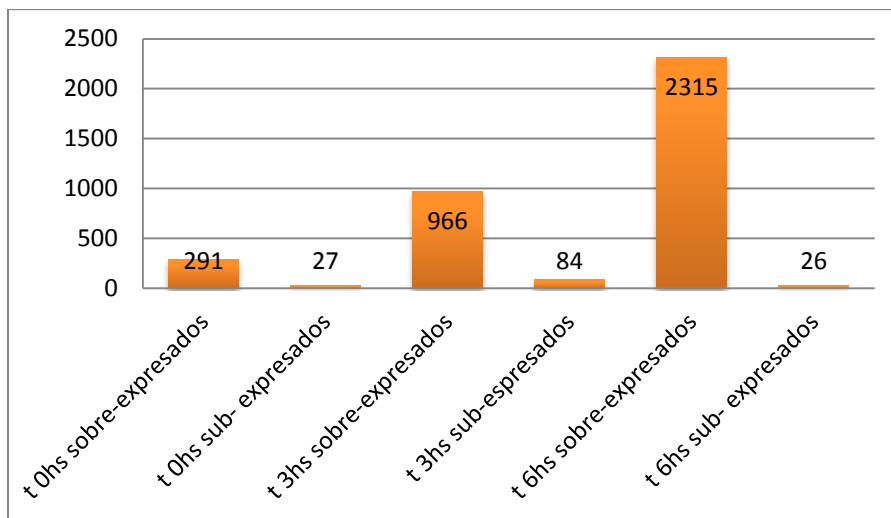


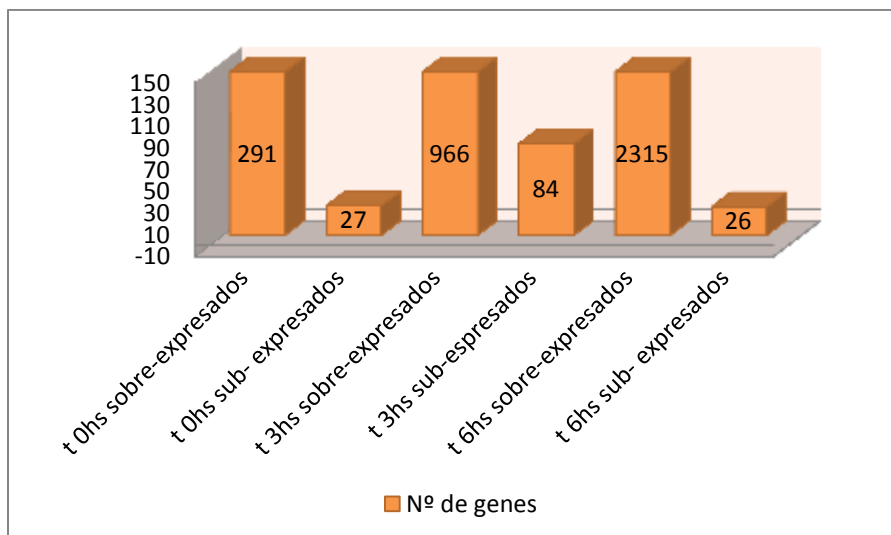
Figura 6. Perfil de expresión parcial de los genes obtenido en el programa MeV. En rojo se muestran los genes sobre-expresados y en verde los genes sub-expresados, con respecto al control. La imagen es una visualización parcial de los genes diferencialmente expresados ya que el programa no permite obtener una imagen de todos los genes.

A través de estos análisis se obtuvo una lista con el número completo de sondas diferencialmente expresadas con respecto al control. Dado que el MeV no permite unificar las sondas correspondientes a un mismo gen, ni filtrar los resultados de los genes no conocidos, se extrajeron los datos y se los depuró manualmente en una planilla de Excel. De esta manera, se generó una lista de genes únicos y conocidos con un valor de *F.C.* mayor a 2,0 y un *FDR* < 0.001 con respecto al control.

Para el tiempo 0hs, se obtuvieron 291 genes sobre-expresados y 27 genes sub-expresados con respecto al control (figura 7). Para el tiempo 3hs, se obtuvieron 966 genes sobre-expresados y 84 sub-expresados con respecto al control (figura 7). Para el tiempo 6hs, se obtuvieron 2315 genes sobre-expresados y 26 genes sub-expresados con respecto al control (figura 7). En el gráfico de la figura 7 se observa que el número de genes sobre-expresados con respecto al control aumenta, en tanto aumenta el tiempo de infección de las células con el parásito. Mientras que el número de genes sub-expresados con respecto al control aumenta a las 3hs de incubación y luego disminuye nuevamente a un valor cercano al inicial.



A



B

Figura 7. A) Representación gráfica en escala real del número de genes diferencialmente expresados con respecto al control, en los distintos tiempos de incubación de las células HeLa con *T. cruzi*. B) Representación gráfica de los mismos datos en escala ajustada,

Para los tres tiempos, se obtuvieron genes sobre-expresados, con un valor de F.C. mayor a 30 (tabla 3). En el tiempo 0hs, se encuentra la IL8 con el mayor valor de *fold change* (F.C. 319,98); le siguen citoquinas pertenecientes a la familia de las quimioquinas con motivo C-X-C y C-C: CCL20 (F.C. 81,66), CXCL3 (F.C. 50,37), CXCL2 (F.C. 51,79); LOC 283174 (F.C. 44,20) un ARN no codificante que no se encuentra completamente caracterizado; y finalmente CCL8 (F.C. 39,23), citoquina perteneciente a la familia de quimioquinas con motivo C-C. Estos genes se encuentran implicados en la respuesta inflamatoria y procesos del sistema inmune. Como se mencionó anteriormente, las citoquinas son pequeñas moléculas de señalización celular producidas por distintos tipos celulares (células nucleadas, en particular células del endo/epitelio y macrófagos residente), son quimiotácticas para distintos tipos celulares (leucocitos, *natural Killer*, linfocitos T, entre otros) que se encuentran implicados en la respuesta inflamatoria.

Para el tiempo 3hs se observa nuevamente CCL20 (F.C. 88,98), IL8 (F.C. 66,22) y LOC283174 (F.C. 39,70); y por último A1BG (F.C. 38,41), gen que codifica para una glicoproteína cuya secuencia es similar a la región hiper-variable de algunas inmunoglobulinas.

Para el tiempo 6hs, nuevamente se repite LOC 283174 (F.C. 40,13) y A1BG (F.C. 30,21).

Cabe mencionar que los genes que codifican para las citoquinas mencionadas y LOC 283174 se encuentran sobre-expresados con respecto al control en las tres condiciones experimentales (tabla 3 y figura 8). La célula HeLa respondería a la presencia del parásito con una fuerte producción de citoquinas que actúan como intermediarias en el proceso de inflamación.

Al analizar la figura 8 se observa que para la mayoría de estos genes (excepto CCL20) el valor de *fold change* es mayor en el tiempo 0hs de incubación, y luego disminuye a medida que aumenta el tiempo de infección. Esto indicaría que al inicio de la infección se observa una fuerte respuesta vinculada a los procesos inflamatorios que si bien disminuye a las siguientes horas, se mantendría elevada; desencadenado una respuesta inmune contra el parásito.

Gen	F.C. T0	F.C. T3	F.C. T6
IL8	319,98	66,22	16,20
CCL20	81,67	88,98	13,80
CXCL3	50,38	9,73	3,82
CXCL2	51,79	10,24	4,89
LOC283174	44,20	39,70	40,22

Tabla 3. Valores de F.C. obtenidos mediante el test estadístico SAM para cada una de las condiciones experimentales. Se detallan los valores de F.C. únicamente de los genes que presentaron valores superiores a 30 en el tiempo 0hs de incubación con el parásito.

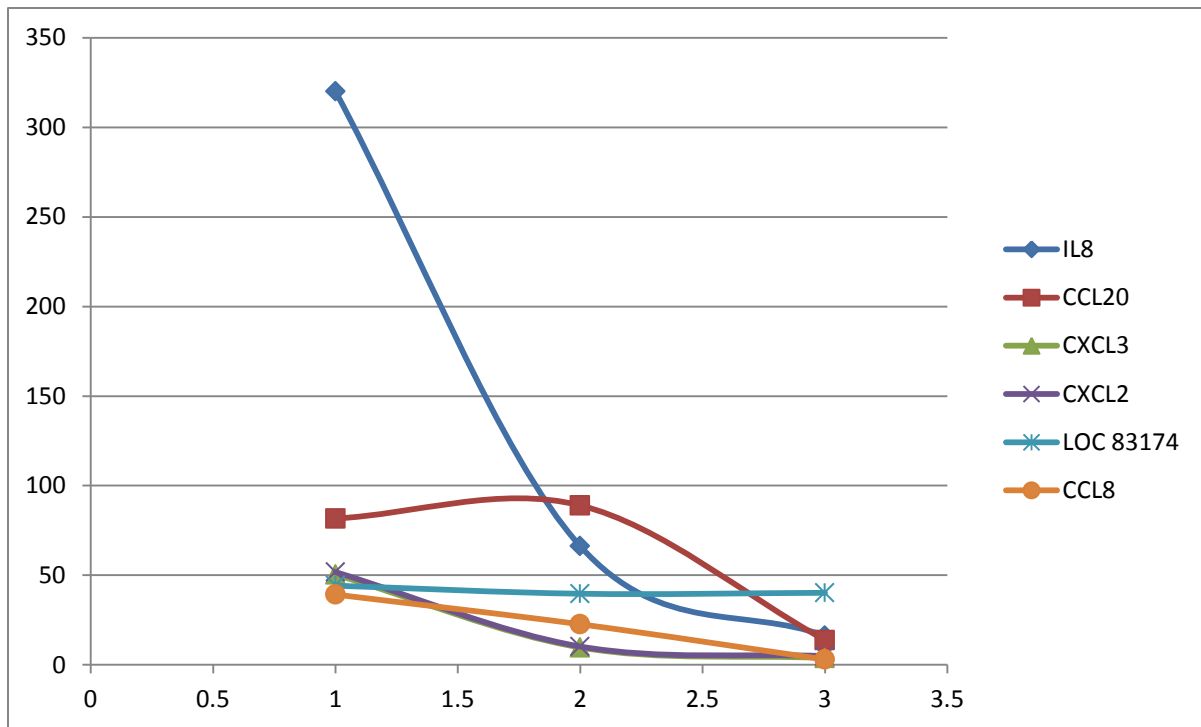


Figura 8. Representación gráfica de los valores de los valores de *fold change* en cada tiempo de infección con *T. cruzi*, de los genes IL8, CCL20, CXCL3, CXCL2, LOC 83174, CCL8

Al analizar los genes sub-expresados con respecto al control no se observan genes con una diferencia de *fold change* mayor a 5,43 con respecto al control, ni que se expresen diferencialmente en las tres condiciones. A modo de lograr una representación visual de este resultado, se generaron *clusters* con los genes únicos sub-expresados y se realizó un diagrama de Venn en el *software* MeV (figura 9).

Se observan genes compartidos entre el tiempo 0hs y 3hs (ARID5B, PLCXD3, VAV3, CXXC4, HEY1, ADRA2A); y 3hs y 6hs (PDE1A, RAB3C, THC255650, METTL7A y PRKCB). A partir del diagrama de Venn, se realizaron los perfiles de expresión (*Heatmap*) de los genes compartidos

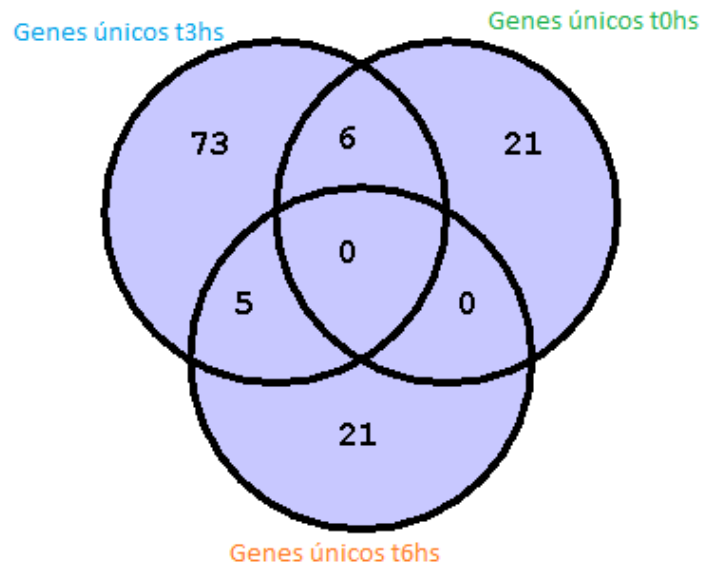


Figura 9. Diagrama de Venn de los genes únicos sub-expresados con respecto al control para 0hs, 3hs y 6hs de incubación con *T. cruzi*.

(figura 10). En color rojo se representan los genes que no presentan una expresión diferencial con respecto al control y en verde aquellos que sí están diferencialmente expresados con respecto al control. Las barras de distintos colores (azul, violeta, verde, rosado y fucsia) laterales representan los *clusters* a los que pertenecen estos genes (t0hs, t3hs, t6hs, inclusión t0hs y t3hs e inclusión t3hs y t6hs respectivamente). En la figura 10 A, se observa que los genes se expresan diferencialmente con respecto al control únicamente en las muestras correspondientes al tiempo 0hs y 3hs de incubación con el parásito; mientras que en la figura 10 B, los genes se expresan diferencialmente con respecto al control, únicamente a las 3hs y 6hs de incubación con el parásito.

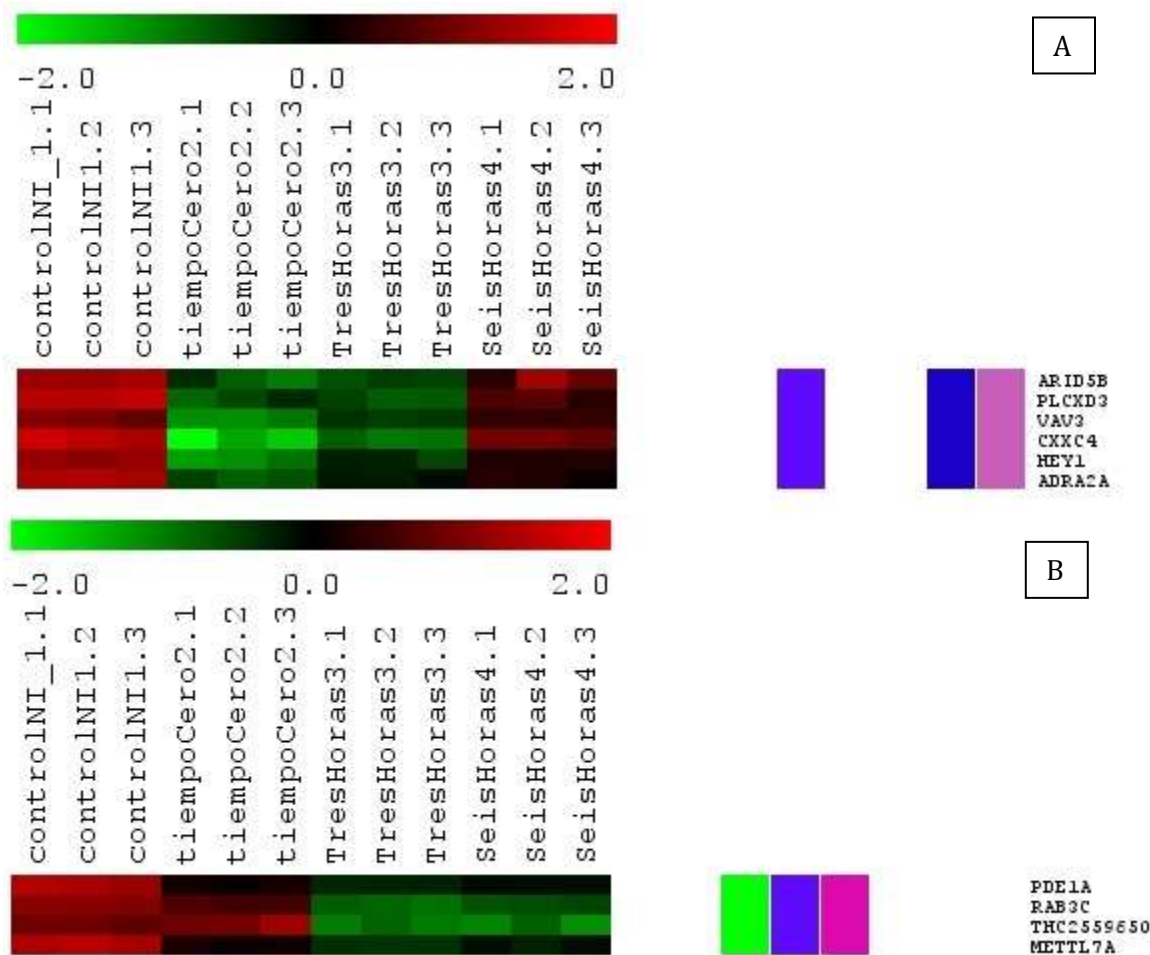


Figura 10. Perfil de expresión de los genes sub-expresados con respecto al control que son compartidos en más de un tiempo. A) Los genes representados son aquellos compartidos entre el tiempo 0hs y 6hs de incubación con el parásito. B) Los genes representados son aquellos compartidos entre el tiempo 3hs y 6hs de incubación con el parásito.

5.4 Estudio de ontología de los genes diferencialmente expresados con respecto al control.

Se realizó el análisis de ontología de genes de funciones moleculares en el *software* R (*Bioconductor*), determinando como umbral un p-valor ajustado de 0,05. Se analizó cada condición experimental de forma independiente, es decir, los genes significativos a las 0hs, 3hs y 6hs de incubación con *T. cruzi*.

En primer lugar se realizó un análisis de ontología de genes resumido (*Gene ontology Slim*). De esta manera se obtuvo una idea general de los grandes procesos biológicos involucrados en el tiempo 0hs, 3hs y 6hs de incubación con *T. cruzi*.

Para el tiempo 0hs, se obtuvieron siete grandes procesos biológicos con un p- valor ajustados menor a 0,05. Estos corresponden (de menor a mayor p valor ajustado) a: procesos del sistema inmune, a la respuesta al estrés, proliferación celular, crecimiento, formación de estructura anatómica involucrada en la morfogénesis y transducción de señales.

Para el tiempo 3hs, se obtuvieron cuatro grandes procesos biológicos significativos. Estos corresponden (de menor a mayor p valor ajustado) a: procesos del sistema inmune, señalización célula-célula, formación de estructura anatómica involucrada en la morfogénesis y desarrollo de estructura anatómica.

Por último, para el tiempo 6hs, se obtuvieron 8 grandes procesos biológicos significativos. Estos corresponden (de menor a mayor p valor ajustado) a: procesos de adhesión celular, procesos del sistema inmune, señalización célula- célula, formación de estructura anatómica involucrada en la morfogénesis, locomoción, desarrollo de estructura anatómica, movilidad celular y transducción de señales.

A partir de este análisis de ontología resumido, se realizó un estudio más detallado, centrado en la vía de la respuesta inmune e inflamación, apoptosis, receptores del tipo Toll y reorganización del citoesqueleto.

Apoptosis

Fue posible analizar únicamente los genes diferencialmente expresados con respecto al control presentes en el tiempo 0hs de incubación con el parásito, ya que en las restantes condiciones el p-valor ajustado fue mayor a 0,05.

Es frecuente que los microorganismo intracelulares utilicen la inhibición de la vía apoptótica como mecanismo de supervivencia o diseminación. Estudios previos han demostrado que la vía de la apoptosis se encuentra fuertemente inhibida en células infectadas por parásitos [41-43]

En la tabla 4 se encuentran los genes vinculados a este proceso correspondientes al tiempo 0hs de incubación con *T. cruzi*. Se puede observar que hay genes implicados en la regulación positiva y negativa de la apoptosis, y que los genes con los valores de *fold change* más elevados (mayor a 10,00) actuarían inhibiendo la vía.

Apoptosis	F.C.	Regulación
IL6	27,37	-
BIRC3	23,55	-
IL1A	17,75	-
BCL2A1	16,43	-
SOD2	10,12	-
PTGS2	9,14	+
TNF	8,72	-/+
ZC3H12A	7,15	
XAF1	6,57	
IER3	5,87	-/+
IL1B	5,77	-/+
IL7	5,26	-
CCL2	5,21	-
TNFSF14	4,39	+
G0S2	4,34	+
NFKBIA	4,16	
NFKB1	4,04	-
INHBA	3,86	+
NACC1	3,44	+
PHLDA1	3,43	
GCH1	3,27	+
BIRC2	3,19	-

Apoptosis	F.C.	Regulación
TNFAIP3	3,03	-
DUSP6	3,02	+
MX1	3,00	+
LCN2	2,95	
IFIH1	2,78	
PMAIP1	2,77	+
SMAD3	2,47	-/+
CYR61	2,46	-/+
CCL5	2,45	-/+
MCL1	2,45	-
THBS1	2,41	-/+
STAT5A	2,37	-/+
RIPK2	2,28	+
CLN3	2,25	-
SAV1	2,18	+
TICAM1	2,12	
TNFRS10B	2,12	
VAV3	0,25	+/-
TNS4	0,23	-
PROC	0,22	+
NKX3-2	0,15	+

Tabla 4. Genes vinculados a la apoptosis. En rojo se resaltan los genes sobre -expresados y en verde los sub-expresados con respecto al control. Los signos (-) y (+) indican la manera en que se encuentran regulando el proceso (inhibiendo o estimulando respectivamente). Aquellos genes que no participan en la regulación presentan este casillero vacío.

A continuación se analizarán los genes cuyo nivel de expresión con respecto al control fue mayor a 10,00 y a su vez, los genes sub-expresados con respecto al control.

Como se observa en la tabla 4, IL6 y BIRC3 son los únicos genes que presentaron un *fold change* mayor a 20,00. IL6 es una citoquina multifuncional que se cree podría estar involucrada en la inhibición de la apoptosis en procesos de inflamación. Esta citoquina sería capaz de unirse a su receptor (IL6-R) y activar la JAK-quinasa, la vía de señalización RAS y PI3K (figura 11). Mediante distintas vías de activación, IL6 es capaz de estimular la supervivencia, inhibiendo la apoptosis y estimulando la proliferación celular.

BIRC3 es un gen que codifica una familia de proteínas IAP (*Inhibitors of Apoptosis*) que inhiben la apoptosis mediante la unión de factores TRAF1 y TRAF2 asociados a TNF (*Tumor Necrosis Factor*).

BIRC3 sería capaz de inhibir la caspasa 3, e inhibir la apoptosis [95]. Como se observa en la figura 12, tanto TNF- α , IL1- β , (genes que se encuentran sobre-expresados en nuestro ensayo, tabla 4) son capaces de activar BIRC3, mediante TRAF 1/2 y NFkB (NFkB1 se encuentra sobre-expresado en nuestro ensayo, tabla 4; y es la sub-unidad de unión al ADN de NFkB) inhibiendo

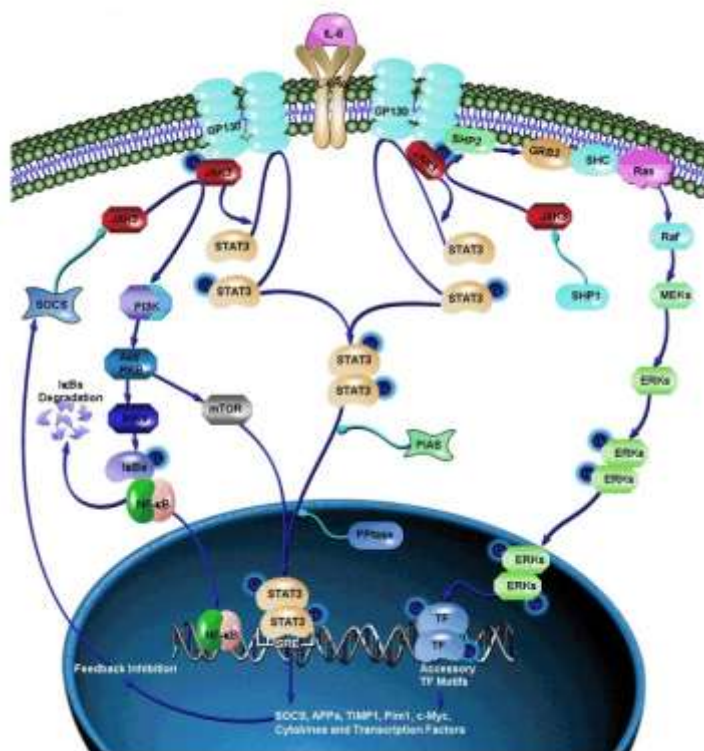


Figura 11. Vía de señalización de IL-6 que inhibe la apoptosis (http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=IL-6_Pathway). IL6 se une a su receptor IL6-R y mediante la vía JAK3 y RAS es capaz de inhibir el proceso de apoptosis y estimular la proliferación celular.

la caspasa 3 y finalmente inhibiendo la apoptosis.

Entre los genes que presentaron un F.C. mayor a 10,00 también se encuentra IL1- α (tabla 4). En la figura 13 se observa que sería capaz de unirse a su receptor IL1 α -R y, mediante la vía Myd88 (la cual se encuentra activada en este ensayo, ver más adelante), activación de IRAKs y otros factores, se activaría NF κ B y Elk-1. Como se mencionó anteriormente NF κ B estimularía BIRC3 e inhibiría la apoptosis (figura 12). Por lo que efectivamente IL1 α inhibiría la vía de apoptosis en las células HeLa.

BCL2A1 es un gen que codifica la proteína A1 perteneciente a la familia BCL. Las proteínas de esta familia pueden presentarse como homo o hetero-dímeros y actuar como factores anti o pro-apoptóticos. En particular A1, sería capaz de reducir la liberación mitocondrial de citocromo C e inhibir la activación de caspasas. Este gen sería un blanco directo de NF κ B en

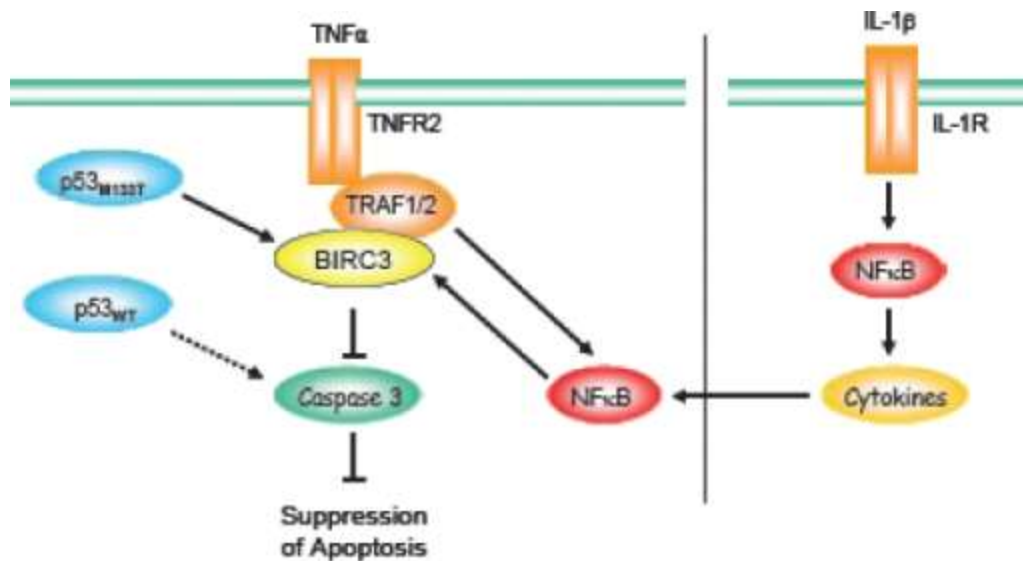


Figura 12. Vía de señalización de TNF- α e IL1- β en donde se observa que activan BIRC3 e inhiben la apoptosis (<http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=3248136 Oncotarget-01-470-g001&req=4>).

respuesta a mediadores del proceso de inflamación (como IL-1 α y TNF) e inhibir la apoptosis (figura 12 y 14).

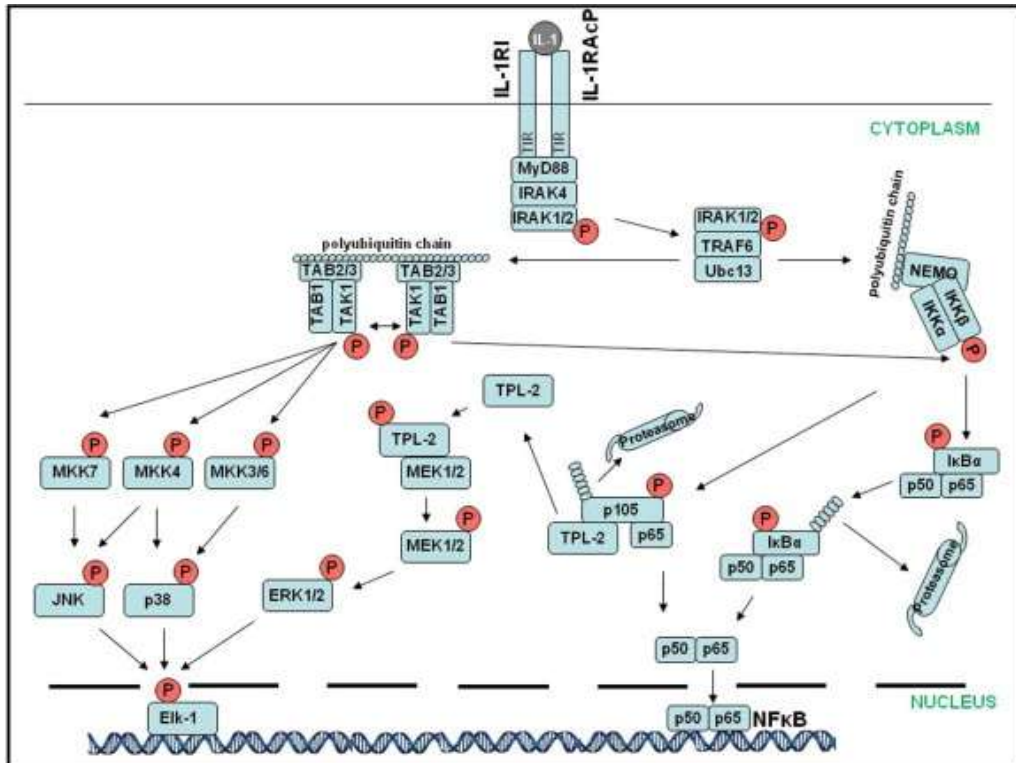


Figura 13. Vía de activación de NFκB mediante IL1α. Como se mencionó anteriormente NFκB es capaz de activar BIRC3 e inhibir la apoptosis.

Por último SOD2 (super-óxido dismutasa) es una importante enzima que participa en la protección contra especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). De acuerdo a la figura 14, la tioredoxina se une a NFκB1 y activa la transcripción del factor anti-apoptótico BCL2, el cual inhibe la formación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial. Esto se lleva a cabo mediante dos factores, BCL2 asociado a BAX, y SOD2.

En la tabla 4 se observa que hay solamente cuatro genes sub-expresados con respecto al control. Entre ellos se encuentra VAV3, un miembro de la familia de genes VAV. Las proteínas VAV son factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs por su palabra en inglés *Guanine nucleotide Exchange Factors*) para GTPasas de la familia Rho/Rac. La sub-expresión de VAV3 induce la apoptosis mediante la inhibición de la vía PI3K/Akt y ERK, lo que lleva a la inhibición por fosforilación de la vía AR [96].

El gen TNS4 promovería la apoptosis mediante la escisión de la caspasa 3. Dado que en este ensayo se encuentra sub-expresado, estaría inhibiendo la vía apoptótica.

PROC o proteína C puede estar bajo la forma activa o inactiva. Cuando se encuentra activa (APC) participa en diversos procesos como en los anti-inflamatorios, anti-apoptóticos y protección de la función de la barrera endotelial. Bajo estas condiciones, PROC se encuentra sub-expresado con respecto al control, por lo que los niveles de APC serían muy bajos o nulos

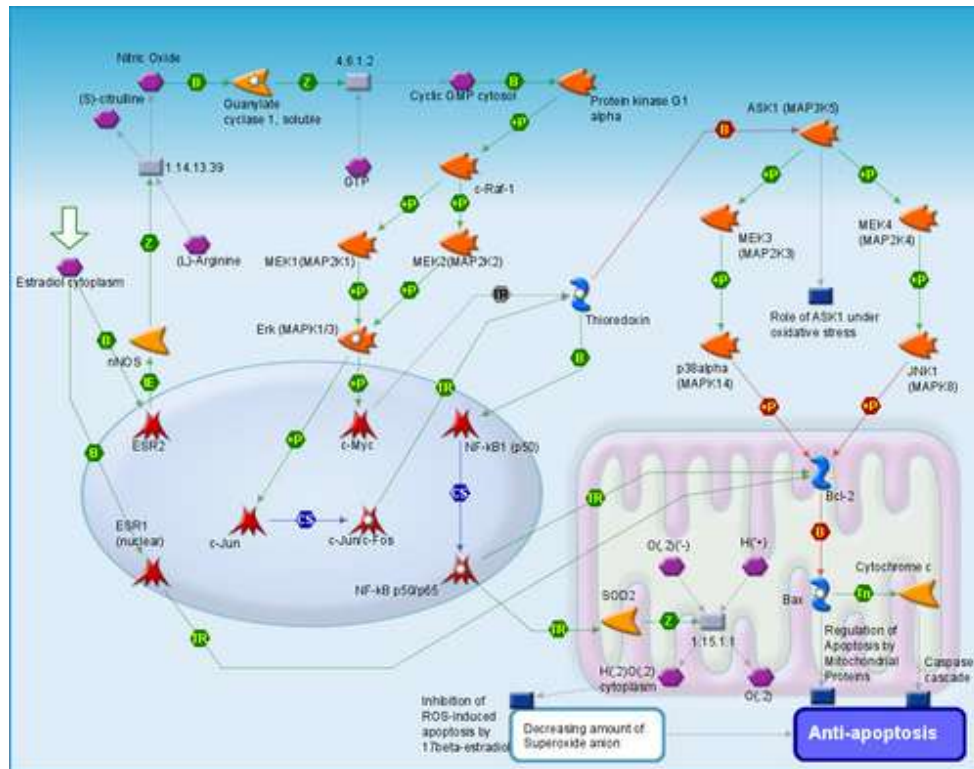


Figura 14. Vía de inhibición de la apoptosis mediante ESR1 y ESR2, receptores nucleares de estrógeno. Se observa cómo SOD2 se encuentra involucrado en este proceso (<http://pathwaymaps.com/maps/2737/>)

(dependiendo del tipo de expresión de dicho gen). Este resultado indicaría que PROC no se encuentra participando en la vía de inhibición de la apoptosis.

Por último el gen NKX3-2 estaría involucrado en el proceso de inhibición de la apoptosis, pero dado que se encuentra sub-expresado con respecto al control, no estaría participando bajo estas condiciones.

Procesos del sistema inmune e inflamación

Es el único proceso que pudo ser analizado en las tres condiciones experimentales ya que su p-valor ajustado fue menor al umbral establecido.

Se obtuvo un total de 209 genes diferencialmente expresados vinculados a procesos del sistema inmune e inflamación. En la tabla 5 se detalla la lista de genes que se encuentran diferencialmente expresados en los tres tiempos de incubación. Se observa únicamente genes sobre-expresados con respecto al control ya que no se encontraron genes sub-expresados presentes en los tres tiempos de incubación.

Esta respuesta inmune se caracteriza por una fuerte y variada producción de citoquinas y quimioquinas. A su vez, estos genes presentaron los mayores niveles de sobre-expresión con respecto al control en el análisis *SAM* (como se discutió en el punto 5.4). Este resultado concuerda con estudios realizados sobre la invasión de *T. cruzi* en células HeLa y en células de cardiomiocitos (ambas como modelo de células no fagocíticas profesionales)[97, 98].

Entre los genes presentes en la tabla 5 y con valores de *fold change* mayores a 10,00, se encuentran varios que codifican para interleuquinas y citoquinas con motivos C-C y CXC. Como se ha discutido previamente, son proteínas que actúan como mediadores de la comunicación celular, regulan el crecimiento, diferenciación y movilidad celular. Son muy importantes a la hora de generar una respuesta inmune frente a un agente patógeno. Algunas de ellas (IL6, IL1 α , IL1 β) también se encuentran involucradas en la inhibición de la apoptosis.

Entre las interleuquinas se encuentra IL1 que activa los linfocitos T y B. También IL6 que es un potente factor pro-inflamatorio en respuesta a la presencia de parásitos, en particular *T. cruzi* [99]. La fuerte expresión de esta citoquina coincide con resultados publicados por Ponce y colaboradores [100] en donde reportaron que la cruzipaina (proteasa secretada por *T. cruzi*) desencadenaría la vía de señalización de TLR2 y subsecuente liberación de IL-6 en cardiomiocitos. La IL7 se encuentra asociada a procesos del sistema inmune y pro-inflamatorios, es una citoquina clave en el desarrollo de los linfocitos T y B. La IL8 es una quimioquina producida por distintos tipos celulares (en particular macrófagos y células del endo/epitelio). Tiene un potente efecto quimiotáctico sobre neutrófilos y linfocitos T, induce la fagocitosis y promueve la angiogénesis. Se ha descrito que este gen se encuentra sobre-expresado en células (no fagocíticas profesionales) infectadas por *T. cruzi* [101] al igual que en este estudio. Por último, la IL11 es una citoquina con una potente acción anti-inflamatoria que inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias [102, 103], podría tener un rol de protección contra la infección del parásito. Estos resultados también coincide con el trabajo

mencionado anteriormente, donde se describió que la IL6, IL8 e IL11 se encuentran sobre-expresado en células HeLa incubadas durante 3 días con *T. cruzi* [97].

Se encontraron citoquinas con motivo C-C y CXC con alto nivel de expresión con respecto al control (CCL20, CCL8, CCL5, CCL2, CXCL1, CXCL2 y CXCL3), también son moléculas pro-inflamatorias que median los procesos de respuesta inmune.

Por último, se observa en la tabla 5 genes asociados con la producción de mediadores de la inflamación. Por ejemplo, PTGS2 y PTGES (no se muestra en las tablas de genes vinculados a la respuesta inmune e inflamación) que se encuentran vinculados a la producción de prostaglandinas. La presencia de estos mediadores concuerda con resultados publicados por Manque y colaboradores sobre infección de *T. cruzi* en cardiomiocitos [59].

Respuesta inmune/Inflamación	F.C. T0	F.C. T3	F.C. T6
IL8	319,98	66,22	16,20
CCL20	81,67	88,98	13,80
CXCL2	51,79	10,24	4,89
CXCL3	50,37	9,73	3,82
CCL8	39,23	22,66	3,02
IL6	27,37	6,91	2,60
CD96	24,90	22,14	3,21
BIRC3	23,55	7,13	2,82
CXCL1	19,87	18,88	7,58
IL1 α	17,75	6,26	2,57
TNIP3	16,41	24,40	8,98
OLR1	16,17	25,13	15,03
PTX3	13,84	13,06	9,22
LMO2	11,56	12,31	4,62
RELB	10,98	9,29	4,96
SOD2	10,12	4,87	4,46
PTGS2	9,14	3,77	2,05
EREG	8,22	12,49	13,77
ZC3H12A	7,15	3,03	2,09
CSF3	6,92	4,65	2,55
CYP4F11	6,33	7,72	5,32
IER3	5,87	2,89	2,16

Respuesta inmune/Inflamación	F.C. T0	F.C. T3	F.C. T6
IL7	5,26	5,83	5,66
TACR1	4,99	7,99	8,28
RASD1	4,61	3,91	3,23
INHBA	3,86	4,70	3,11
LIF	3,80	2,90	3,12
BDKRB1	3,74	4,61	2,81
IL11	3,31	3,09	2,44
TNIP1	3,30	4,51	2,95
NFRKB	3,26	3,93	2,25
PLA2G7	3,03	12,42	3,04
TNFAIP6	3,02	2,41	2,25
MX1	3,00	3,26	3,97
CFB	2,99	2,46	2,44
RSAD2	2,98	3,70	2,08
LCN2	2,95	5,54	4,89
MT1G	2,76	3,96	2,88
HDAC4	2,67	2,59	2,24
PANX1	2,67	3,31	2,49
CCL5	2,45	2,47	2,58
THBS1	2,41	2,65	2,41
PTPRE	2,29	2,61	2,50
RIPK2	2,28	2,43	2,57
OAS3	2,12	2,05	2,04

Tabla 5. Genes diferencialmente expresados con respecto al control vinculados a la respuesta del sistema inmune e inflamación. Solamente se incluyen aquellos diferencialmente expresados con respecto al control en los tres tiempos de incubación de las células HeLa con el parásito.

De los 209 genes expresados diferencialmente, solamente 10 se encontraron sub-expresados con respecto al control (tabla 6). Únicamente VAV3 y PRKCB, se encuentran diferencialmente expresados en más de un tiempo de infección con el parásito (tabla 6 y diagrama de Venn punto 5.4).

Como se mencionó anteriormente VAV3 participa en la regulación de la apoptosis, pero también parecería tener un rol muy importante en la formación de sinapsis fagocíticas entre neutrófilos apoptóticos y macrófagos [104]. Dado que se encuentra sub-expresado con respecto al control, no estaría estimulado este proceso.

Respuesta inmune/Inflamación	F.C. T0	F.C. T3	F.C. T6
MEIS1	0,37	S/V	S/V
VAV3	0,25	0,38	S/V
PROC	0,22	S/V	S/V
NKX3-2	0,15	S/V	S/V
EDN2	0,074	S/V	S/V
CNR1	S/V	0,20	S/V
PRKCB	S/V	0,25	0,35
TP53	S/V	0,35	S/V
C1RL	S/V	0,32	S/V
ZC3HAV1	S/V	S/V	0,31

Tabla 6. Genes diferencialmente expresados con respecto al control vinculados a la respuesta del sistema inmune e inflamación. El color azul indica que los genes presentan una expresión diferencial significativa con respecto al control. S/V (sin valor) significa que no se obtuvo valor de *fold change* correspondiente.

PRKCB es un gen que codifica para una enzima Protein quinasa-C, es una familia de proteínas específicas de serina y treonina que están involucradas en diversas vías de señalización celular. Esta proteína estaría involucrada en la activación de linfocitos B, inducción de la apoptosis, entre otros. Bajo estas condiciones el gen se encuentra sub-expresado con respecto al control, por lo que el estaría inhibiendo la vía de inflamación y sistema inmune.

Se observa que para muchos genes sub-expresados con respecto al control no se obtuvo un valor de *fold change* como resultado del SAM (S/V). Esto indica que los genes no se encuentran

diferencialmente expresados bajo los parámetros establecidos para el análisis estadístico (FDR<0.001 y F.C. de 2,0).

Reorganización del citoesqueleto

Si bien uno de los objetivos de este trabajo es el análisis de esta vía, no es posible realizarlo ya que el p-valor de la ontología de genes fue mayor a 0,05 en las tres condiciones experimentales.

Receptores tipo Toll

Con respecto al proceso de receptores tipo Toll (TLRs) únicamente fue posible analizar los genes diferencialmente expresados con respecto al control presentes en el tiempo 0hs de incubación con el parásito, ya que en las restantes condiciones el p-valor ajustado fue mayor al umbral establecido.

En la tabla 7 se detallan genes con su valor de *fold change* correspondiente y se observa que todos se encuentran sobre-expresados con respecto al control.

Vía de señalización de receptores tipo Toll	F.C.
NFKBIA	4,16
RIPK2	2,28
NFKB1	4,04
TNFAIP3	3,03
MAP2K3	2,68
NFKB2	4,01
BIRC3	23,55
BIRC2	3,19
TNIP1	3,30
DUSP6	3,02
TICAM1	2,12
RSAD2	2,98
TNIP3	16,41

Tabla 7. Genes vinculados a la vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLRs).

Mediante el análisis de ontología de genes se encontraron genes diferencialmente expresados vinculados únicamente a la vía TLR2, TLR4 (dependiente de MyD88) y TL3 (independiente de MyD88).

Como se observa en la figura 15, la activación de estas vías de TLRs conduce a una fuerte producción de citoquinas pro-inflamatorias, que coincide con el análisis realizado sobre procesos vinculados al sistema inmune e inflamación.

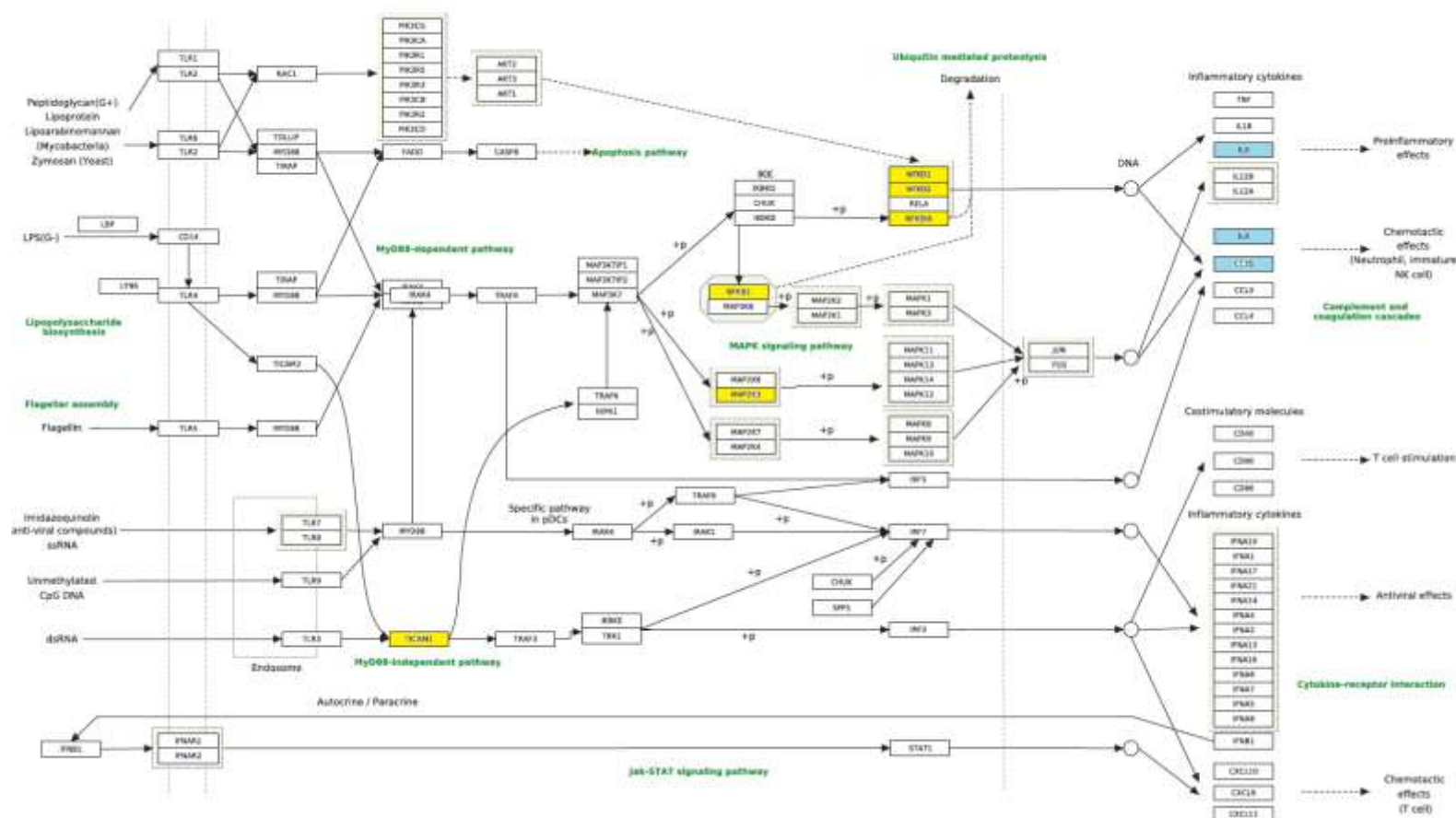


Figura 15. Representación de la vía de receptores tipo Toll (www.wikipathways.org) para Homo Sapiens. En amarillo se resaltan los genes diferencialmente expresados con respecto al control involucrados en esta vía, obtenidos mediante el análisis de ontología de genes. En celeste se resaltan las citoquinas pro-inflamatorias que se encuentran diferencialmente expresadas con respecto al control, obtenidas mediante el análisis de ontología de genes.

En la figura 15 se encuentran resaltados en amarillo aquellos genes que se obtuvieron mediante el análisis de ontología y que se observan también en el diagrama. El gen TICAM1 se encuentra sobre-expresado con respecto al control y si se analiza el diagrama de la figura 15 se observa que la expresión de este gen se activa a través del receptor TLR3. También se encuentran sobre expresados con respecto al control los genes NFKB1, NFKB2, NFKBIA y MAP2K3. Al analizar el diagrama se observa que la expresión de estos genes puede darse a través de varias vías, entre ellas TLR3, TLR2 y TLR4.

5.5 Análisis de genes individuales mediante RT-PCR en tiempo real.

A partir de los resultados del test estadístico SAM se eligieron genes para validar el ensayo de microarreglos mediante qRT-PCR. Todos los genes presentaron un q-valor de 0, por lo que la selección de los mismos se basó únicamente en su *fold change*. Dado que este valor varía en cada uno de los tiempos, se seleccionaron aquellas muestras que presentaron mayor valor *fold change* para el gen a estudiar. De la lista de genes sobre-expresados con respecto al control se seleccionó: IL-8, IL1 α , CXCL2, BIRC3, IL-6 y NFKB1. De la lista de los genes sub-expresados con respecto al control se seleccionó: CXXC4, PRR15 y PRKCB.

En la tabla 8 se presentan los valores de *F.C.* para los genes en los distintos tiempos de incubación con el parásito (0hs, 3hs y 6hs) y se resaltan los tiempos seleccionados para la validación. Para estudiar la expresión de IL-8, IL-1 α , BIRC3, CXCL2, NFKB1, IL-6, CXXC4, PRR15 se trabajó con la muestra correspondiente al tiempo 0hs, mientras que para estudiar la expresión de PRKCB se trabajó con la muestra correspondiente al tiempo 3hs.

Nombre del Gen	<i>F.C.</i> t 0hs	<i>F.C.</i> t 3hs	<i>F.C.</i> t 6hs
IL-8	319,98	66,22	16,20
IL-1 α	17,75	6,26	2,57
BIRC3	23,55	7,13	2,81
CXCL2	51,79	10,24	4,88
NFKB1	4,04	2,20	
IL-6	27,37	6,91	2,60
CXXC4	0,10	0,19	S/V
PRR15	0,23	S/V	S/V
PRKCB	S/V	0,33	0,39

Tabla 8. Tabla con valores de *F.C.* para cada gen en los tiempos 0, 3 y 6 horas. Se observan resaltados los tiempos seleccionados para la validación de la técnica de microarreglos mediante RT-PCR en tiempo real. S/V (sin valor) se utiliza para indicar que no se obtuvo valor de *fold change* correspondiente.

En la tabla 8 se observa que para el tiempo 6hs de NFKB1 y de CXXC4, así como para el tiempo 3 y 6 hs de PRR15, y el tiempo 0hs de PRKCB, no se obtuvo un valor de *F.C.* que superara el umbral impuesto para el análisis SAM (S/V). Como se discutió anteriormente, únicamente se

puede afirmar que dichos genes no presentan una expresión diferencial significativa de acuerdo a los parámetros fijados para el análisis estadístico.

Se realizó una qRT-PCR en tiempo real con los cebadores diseñados (tabla A1 del anexo). Se obtuvieron curvas de cuantificación y fusión para cada gen de interés en las muestras estudiadas y se determinó que no se trabajaría con aquellas cuya curva de fusión no fuera óptima. A modo de ejemplo, la figura 16 muestra las curvas de fusión para el gen IL8, y se observa que aquella correspondiente al control 3 se comporta diferente al resto, por lo que no se consideró para el análisis.

Se trabajó cada réplica por duplicado, contándose con al menos una réplica de cada tiempo para realizar el análisis.

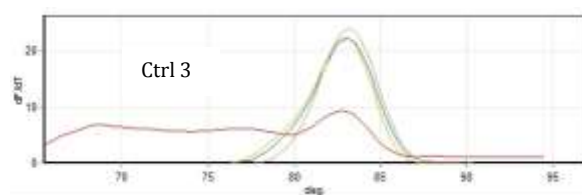
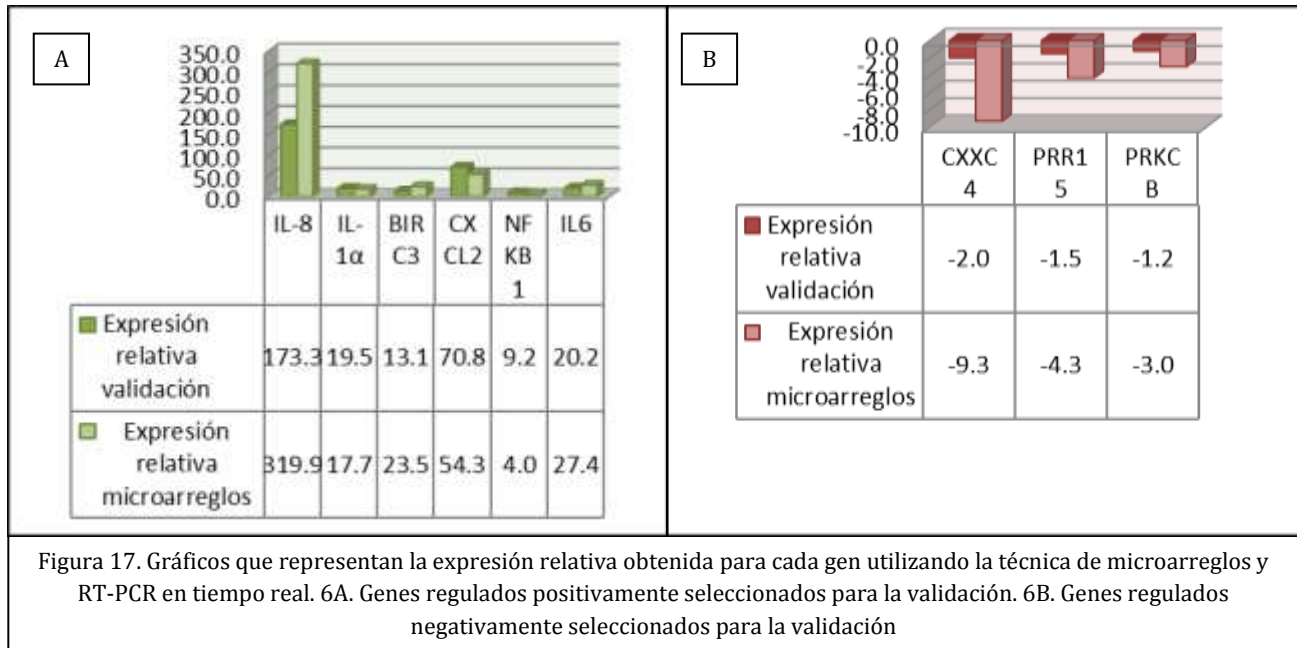


Figura 16. Curvas de fusión para los transcritos de la IL8. La curva correspondiente a la muestra del control 3 se comporta muy diferente a las demás. Por lo que se tomó la decisión de no considerarla al realizar los cálculos de Ct.

Se extrajeron los valores de Ct para el cálculo de la expresión relativa de los genes de interés de acuerdo a la ecuación 3 (punto 4.7).

En los gráficos de la figura 17 se observa la expresión relativa obtenida mediante qRT-PCR y la expresión de los mismos genes obtenida mediante la técnica de microarreglos. Para los genes sobre-expresados con respecto al control, la expresión relativa obtenida en la validación



es: 173,9 para IL-8, 19,5 para IL-1α, 13,1 para BIRC3, 70,8 para CXCL2, 9,2 para NFκB1, 20,2 para IL-6. Mientras que la expresión obtenida mediante la técnica de microarreglos es: 319,9 para IL-8, 17,7 para IL-1α, 23,5 para BIRC3, 54,3 para CXCL2, 4,0 para NFκB1 y 27.4 para IL-6. En cuanto a los genes sub-expresados con respecto al control, la expresión relativa se presenta como (-1/n) para mejorar la visualización. Mediante la validación se obtuvieron los siguientes valores: -2,0 para CXXC4, -1,5 para PRR15, y -2,0 para PRKCB. Mientras que la expresión obtenida mediante la técnica de microarreglos es: -9,3 para CXXC4, -4,3 para PRR15 y -3,0 para PRKCB.

Si bien existen diferencias entre los valores de expresión relativa obtenidos a través de ambas técnicas, se observa una concordancia en los resultados. La IL8 presenta el mayor valor de expresión relativa, mientras que NFκB1 el menor valor de expresión relativa, en ambas técnicas (de los genes sobre-expresados con respecto al control). Este resultado también se observa en los genes sub-expresados con respecto al control.

6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

6.1 Identificación de los genes que presentan una expresión diferencial significativa con respecto al control.

A partir del reporte de control de calidad de *Agilent Technologies* y del análisis de componentes principales, se determinó que la calidad del ensayo de microarreglos fue apropiada para continuar con los análisis posteriores.

Mediante el análisis estadístico *significance analysis of microarray* realizado en el programa *MeV*, se obtuvo una lista de genes diferencialmente expresados con respecto al control para cada tiempo evaluado, cuyos valores de *F.C.* y FDR superaron el umbral impuesto (>2.0 y 0.001% respectivamente). Esta lista de genes presentaron sondas duplicadas o genes que carecían de una caracterización, por tanto, el número final de genes únicos con los que se trabajó para estudiar su ontología en el *software* R (*Bioconductor*) fue menor.

El programa *MeV* presenta toda la lista de genes significativos, utilizando únicamente este programa, no fue posible obtener una lista de genes únicos y caracterizados. Es necesario contar con otras herramientas para analizar los datos correctamente, de lo contrario se sobre-estimaría el número de genes significativos con respecto al control.

Para el tiempo 0hs de incubación de las células HeLa con el parásito, se obtuvieron 291 genes sobre-expresados y 27 sub-expresados con respecto al control. Para el tiempo 3hs, se obtuvieron 966 genes sobre-expresados y 84 sub-expresados con respecto al control. Y para el tiempo 6hs, se obtuvieron 2315 genes sobre-expresados y 26 genes sub-expresados con respecto al control. A medida que aumenta el tiempo de infección de las células con *T. cruzi*, aumenta el número de genes sobre-expresados con respecto al control (figura 18). En cambio, el número de genes sub-expresados con respecto al control es muy similar para el tiempo de infección de 0hs y 6hs, mientras que el número de genes aumenta significativamente a las 3hs (figura 12). En un trabajo presentado por Manque y colaboradores [59], en donde estudian la infección de *T. cruzi* en cardiomiocitos entre 1-48 hs de incubación obtienen resultados comparables. Al igual que aquí, el número de genes sobre-expresados aumenta con el tiempo de infección con el parásito. Lo que podría indicar que a medida que *T. cruzi* se adhiere a la

célula (0hs), ingresa (3hs), sale de la vacuola parasitófora (6hs) y comienza la lisis celular (24-48hs), se estimula la expresión de genes involucrados en diversas vías.

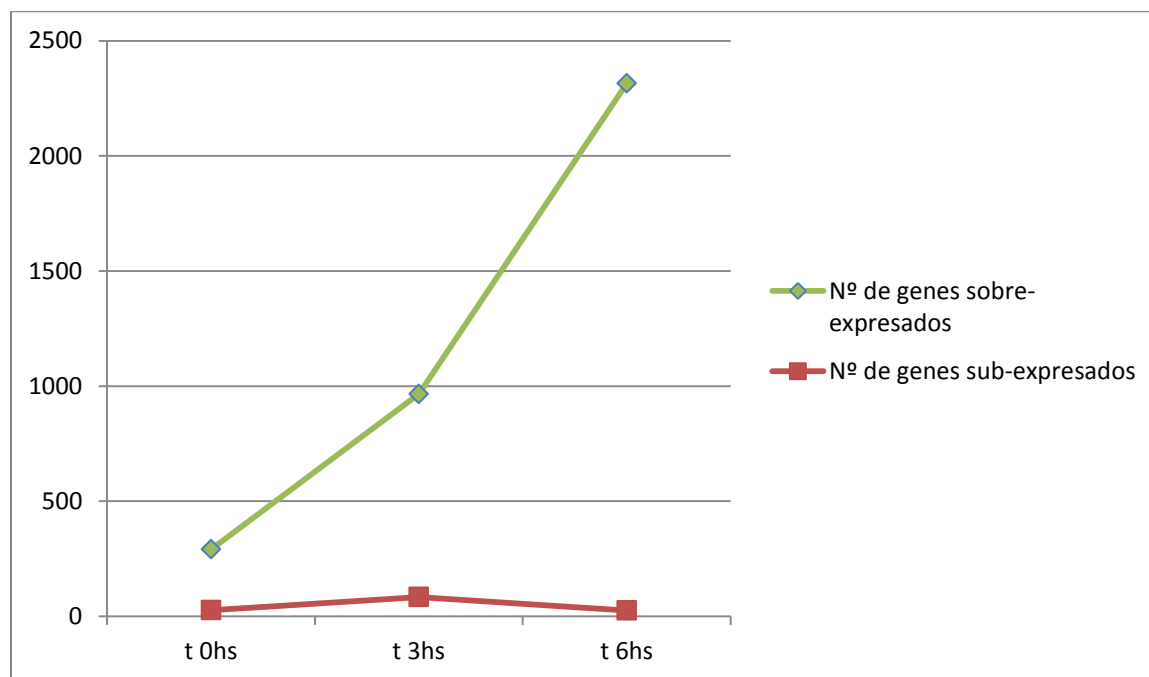


Figura 18. Gráfico de líneas del número de genes sobre y sub-expresados con respecto al control para los tres tiempos de incubación de las células HeLa con *T. cruzi* (0hs, 3hs y 6hs). A medida que aumenta el tiempo de infección, aumentó el número de genes sobre-expresados con respecto al control. El número de genes sub-expresados con respecto al control aumenta a las 3hs pero luego vuelve a disminuir.

Cabe destacar que los genes que presentaron mayor valor de *fold change* con respecto al control en los tres tiempos de incubación fueron aquellos vinculados a inmunidad e inflamación. Más aún, en su mayoría el valor de *fold change* más elevado se observó a las 0hs de incubación. Este resultado indicaría que al adherirse *T. cruzi*, la célula HeLa responde con una fuerte expresión de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias, y se mantiene durante las siguientes horas estudiadas. Esto concuerda con trabajos publicados [59, 97] sobre la infección de este parásito en células “no fagocíticas profesionales” (cardiomiocitos y HeLa). Por lo que de acuerdo a estos resultados, los niveles de expresión de genes vinculados a la respuesta inmune e inflamación se sobre-expresarían tanto al momento desde la adhesión del parásito a la célula, como en la penetración e inicio de la infección.

6.2 Estudio de la ontología de los genes diferencialmente expresados con respecto al control.

Al realizar el análisis resumido de ontología de genes se obtuvieron siete grandes procesos con un p-valor ajustado menor a 0,05: procesos del sistema inmune, procesos involucrados a la respuesta al estrés, proliferación celular, crecimiento, formación de estructura anatómica, involucrados en la morfogénesis y transducción de señales. Estas respuestas son consistentes con la presencia de un agente patógeno. En particular, el proceso con mayor peso estadístico fue el involucrado en el sistema inmune, lo que coincide con la fuerte producción de citoquinas y quimoquinas pro-inflamatorias discutido anteriormente.

Como parte de nuestros objetivos, planteamos analizar el efecto de la infección de *T. cruzi* en distintas vías de las células HeLa. En particular, la vía de apoptosis, respuesta inflamatoria, reorganización del citoesqueleto y receptores tipo Toll. El único proceso que no fue posible discutir fue la reorganización del citoesqueleto, ya que su p-valor ajustado fue mayor a 0,05. Por otro lado, el único proceso que fue posible analizar para las tres condiciones experimentales, fue la respuesta del sistema inmune e inflamación dado que su p-valor ajustado fue menor al umbral establecido. Por último, se analizó los procesos relacionados a los receptores Tipo Toll y apoptosis en el tiempo 0hs de incubación con el parásito, ya que el p-valor ajustado de las restantes condiciones fue mayor a 0.05.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante este análisis, se observa que la adhesión de *T. cruzi* en células HeLa activaría la vía de señalización de TLRs, en particular los TLR2, TLR3 y TLR4, dependiente e independiente de MyD88.

La activación de la vía TLR3 estaría mediada por la sobre-expresión del gen TICAM1, lo que estimularía la expresión de MAP2K3 y NFKB1. A su vez, de acuerdo al diagrama de la figura 10, los genes NFKB1, NFKB2, NFKBIA y MAP2K3 podrían ser estimulados a través de distintas vías de TLRs; pero de acuerdo al análisis de ontología de genes las únicas vías significativas serían TLR2, TLR3 y TLR4. Por lo que se concluye que la expresión de estos genes estaría únicamente vinculada a estos receptores.

La sobre expresión de los genes mencionados desencadena una fuerte producción de citoquinas pro-inflamatorias, en la figura 13 se observan resaltados en celeste IL8, IL6 y CCL5.

Como se discutió anteriormente, los genes que presentaron un mayor nivel de expresión con respecto al control en todas las condiciones codifican para citoquinas y quimoquinas. Por lo que la presencia del parásito, generaría una fuerte respuesta inflamatoria y del sistema inmune en células HeLa.

Tanto la activación de estas vías como las distintas citoquinas producidas (IL11, IL8, IL6, IL7, IL1A, IL1B) coincide con trabajos publicados anteriormente. De acuerdo a estos resultados, podría decirse que la expresión diferencial de estos genes es muy importante para en la respuesta de la célula y se mantendrían en niveles elevados a las siguientes horas de infección del parásito.

Con respecto al proceso de apoptosis, si bien se obtuvieron genes vinculados a la regulación pro y anti-apoptótica, aquellos que presentaron mayor nivel de expresión diferencial fueron los relacionados a la inhibición de la vía. En particular cinco genes (IL6, BIRC3, IL1A, BCL2A1 y SOD2) presentaron un F.C. mayor a 10,00 lo que indicaría que bajo estas condiciones, se encuentran fuertemente expresados.

Como se mencionó anteriormente muchos parásitos utilizan la inhibición de la apoptosis como mecanismo de persistencia en la célula huésped. Dado que esta inhibición se observa a las 0hs de incubación con *T. cruzi*, podemos deducir que su adhesión sería capaz de activar genes implicados en este proceso.

6.3 Validación del ensayo de microarreglos.

Mediante la realización de ensayos de RT-PCR en tiempo real se pudo calcular los valores de expresión relativa de los genes seleccionados. Al comparar dichos valores con los obtenidos a partir del análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la técnica de microarreglos, podemos afirmar que presentan un comportamiento similar desde el punto de vista del nivel de expresión en ambos ensayos. La mayor diferencia entre el valor de expresión relativa calculada a partir del ensayo de RT-PCR en tiempo real y la obtenida luego del análisis estadístico SAM de los resultados de los microarreglos se obtuvo para el gen CXXC4 (casi 5 veces), regulado negativamente con respecto al control. Mientras que para el resto de los genes las diferencias entre ambos valores varía entre 1.10 y 2.87. Se observa una mayor diferencia para los genes regulados negativamente que para aquellos regulados positivamente.

Cabe destacar que en todos los casos concuerda la expresión relativa con respecto al control, ya sea positiva como negativa de ambos ensayos.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Tarleton, R.L., *Immune system recognition of Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 430-4.
2. Fernandes, M.C. and N.W. Andrews, *Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 734-47.
3. Tarleton, R.L. and L. Zhang, *Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?* Parasitol Today, 1999. **15**(3): p. 94-9.
4. Zhang, L. and R.L. Tarleton, *Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 480-6.
5. Chagas, C., *Nova Tripanosomíaze Humana: Estudos sobre amorfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de uma nova entidade mórbida do homem*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1909. **1**: p. 159-218.
6. Forde, R.M., *Some clinical notes on a European patient in whose blood a trypanosome was observed*. J Trop Med, 1902. **5**: p. 261-263.
7. Chagas, C., *Tripanosomíaze americana. Forma aguda da moléstia*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1916. **8**: p. 37-65.
8. Chagas, C., *Processos patojénicos da tripanozomíaze americana*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1916 **8**: p. 5-36.
9. Chagas, C. and E. Villela, *Forma cardíaca da Tripanosomíaze americana*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1922. **14**: p. 5-61.
10. Chagas, C., *Sobre um trypanosoma do tatú. Tatusia novemcincta, transmitido pelo Triatoma geniculata Latr (1811) Possibilidade de ser o tatú um depositário do Trypanosoma cruzi no mundo exterior*. Brasil-med, 1912. **26**: p. 305-306.
11. Chagas, C., *Infection naturelle des singes du Pará (Crysotrix sciureus)*. Comp. Rend. Séac. Soc. Biol. Sés. Fin., 1924. **90**: p. 873-876.
12. Coura, J.R. and J. Borges-Pereira, *Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review*. Acta Trop, 2010. **115**(1-2): p. 5-13.
13. Coura, J.R. and J.C. Dias, *Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 31-40.
14. Aragão, M.B., *Domiciliac, ão de triatomíneos ou pré-adaptac, ão à antropofilia e à ornitofilia?* Rev. Saúde Públ. (S Paulo) 1983. **17**: p. 51-55.
15. Stevens, J.R. and W. Gibson, *The molecular evolution of trypanosomes*. Parasitol Today, 1999. **15**(11): p. 432-7.
16. Stevens, J.R., et al., *The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, Trypanosoma brucei and T. cruzi*. Parasitology, 1999. **118 (Pt 1)**: p. 107-16.
17. Stevens, J.R., et al., *The molecular evolution of Trypanosomatidae*. Adv Parasitol, 2001. **48**: p. 1-56.
18. Hamilton, P.B., M.M. Texeira, and J.R. Stevens, *The evolution of Trypanosoma cruzi: the "bat seeding" hypothesis*. Trends Parasitol, 2012. **28**: p. 136-141.
19. Aufderheide, A.C., et al., *A 9,000-year record of Chagas' disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2034-9.
20. Bernstein, R.E., *Darwin's illness: Chagas' disease resurgens*. J R Soc Med, 1984. **77**(7): p. 608-9.
21. Tanowitz, H., et al., *Studies of in vitro infection by Trypanosoma cruzi. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells*. Am J Trop Med Hyg, 1975. **24**(1): p. 25-33.
22. Nogueira, N. and Z. Cohn, *Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells*. J Exp Med, 1976. **143**(6): p. 1402-20.
23. de Araujo-Jorge, T.C., *The biology of Trypanosoma cruzi-macrophage interaction*. Mem I Oswaldo Cruz, 1989. **84**: p. 441-462.

24. Dvorak, J.A. and T.P. Hyde, *Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels*. Exp Parasitol, 1973. **34**(2): p. 268-83.
25. Gutierrez, F.R., et al., *The role of parasite persistence in pathogenesis of Chagas heart disease*. Parasite Immunol, 2009. **31**(11): p. 673-85.
26. Tarleton, R.L., *The role of T cells in Trypanosoma cruzi infections*. Parasitol Today, 1995. **11**(1): p. 7-9.
27. Bixby, L.M. and R.L. Tarleton, *Stable CD8+ T cell memory during persistent Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2008. **181**(4): p. 2644-50.
28. Dias, E., et al., *Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study*. Circulation, 1956. **14**(6): p. 1035-60.
29. Dias, J.C.P., *Acute Chagas' disease*. Mem I Oswaldo Cruz, 1984. **79** (suppl): p. 85-91.
30. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas disease*. Lancet, 2010. **375**(9723): p. 1388-402.
31. Machado, F.S., et al., *Pathogenesis of Chagas disease: time to move on*. Front Biosci (Elite Ed), 2012 **4**: p. 1743-58.
32. Brener, Z., *Biology of Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol, 1973. **27**: p. 347-82.
33. Macedo, A.M. and S.D. Pena, *Genetic Variability of Trypanosoma cruzi: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease*. Parasitol Today, 1998. **14**(3): p. 119-24.
34. Tafuri, W.L., *Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies*. Am J Trop Med Hyg, 1970. **19**(3): p. 405-17.
35. da Silveira, A.B., M.A. Freitas, and E.C. de Oliveira, *Neuronal plasticity of the enteric nervous system is correlated with chagasic megacolon development*. Parasitology, 2008. **135**: p. 1337-1342.
36. Kalil, J. and E. Cunha-Neto, *Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last?* Parasitol Today, 1996. **12**(10): p. 396-9.
37. Combs, T.P., et al., *The adipocyte as an important target cell for Trypanosoma cruzi infection*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 24085-94.
38. Nagajyothi, F., et al., *Response of adipose tissue to early infection with Trypanosoma cruzi (Brazil strain)*. J Infect Dis, 2012. **205**(5): p. 830-40.
39. Palomino, S.A., V.D. Aiello, and M.L. Higuchi, *Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and Trypanosoma cruzi antigens*. Ann Trop Med Parasitol, 2000. **94**(6): p. 571-9.
40. Elias, F.E., et al., *Analysis of the presence of Trypanosoma cruzi in the heart tissue of three patients with chronic Chagas' heart disease*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **68**(2): p. 242-7.
41. Carmen, J.C. and A.P. Sinai, *Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites*. Mol Microbiol, 2007. **64**(4): p. 904-16.
42. Hashimoto, M., J. Nakajima-Shimada, and T. Aoki, *Trypanosoma cruzi posttranscriptionally up-regulates and exploits cellular FLIP for inhibition of death-inducing signal*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(8): p. 3521-8.
43. Nakajima-Shimada, J., et al., *Inhibition of Fas-mediated apoptosis by Trypanosoma cruzi infection*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1475**(2): p. 175-83.
44. Vaux, D.L., G. Haeccker, and A. Strasser, *An evolutionary perspective on apoptosis*. Cell, 1994. **76**(5): p. 777-9.
45. de Melo-Jorge, M. and M. PereiraPerrin, *The Chagas' disease parasite Trypanosoma cruzi exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts*. Cell Host Microbe, 2007. **1**(4): p. 251-61.
46. Chuenkova, M. and M. Perrin, *Trypanosoma cruzi targets AKt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy*. Sci Signal, 1996. **17**: p. 94.
47. Dias, W.B., et al., *Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol, 2008. **10**(1): p. 88-99.

48. Cunha-Neto, E., et al., *Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 252-8.
49. Florez, O., J. Martin, and C.I. Gonzalez, *Genetic variants in the chemokines and chemokine receptors in Chagas disease*. Hum Immunol, 2012. **73**(8): p. 852-8.
50. Taub, D.D., et al., *Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta*. Science, 1993. **260**(5106): p. 355-8.
51. Gao, J.L., et al., *Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1*. J Exp Med, 1997. **185**(11): p. 1959-68.
52. Yoshie, O., T. Imai, and H. Nomiyama, *Chemokines in immunity*. Adv Immunol, 2001. **78**: p. 57-110.
53. Machado, F.S., et al., *Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 3003-8.
54. Coelho, P.S., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(5): p. 837-44.
55. Cunha-Neto, E., et al., *Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy*. Am J Pathol, 2005. **167**(2): p. 305-13.
56. Medeiros, G.A., et al., *Treatment of chronically Trypanosoma cruzi-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage*. Microbes Infect, 2009. **11**(2): p. 264-73.
57. Marino A. P., et al., *CC chemokine receptors: a potential therapeutic target for Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100**: p. 93.
58. Talvani, A., et al., *Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(7): p. 943-50.
59. Manque, P.A., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes*. Infect Immun, 2011. **79**(1855).
60. Aliberti, J.C., et al., *beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4819-26.
61. Talvani, A., et al., *Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi*. Microbes Infect, 2000. **2**(8): p. 851-66.
62. Aliberti, J.C., et al., *Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during Trypanosoma cruzi infection*. Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1433-40.
63. Silva, J.S., et al., *Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection*. J Exp Med, 1992. **175**(1): p. 169-74.
64. Aliberti, J.C., et al., *Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 1961-7.
65. Camargo, M.M., et al., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages*. J Immunol, 1997. **158**(12): p. 5890-901.
66. Tardieux, I., et al., *Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1117-30.
67. Woolsey, A.M., et al., *Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3611-22.
68. Woolsey, A.M. and B.A. Burleigh, *Host cell actin polymerization is required for cellular retention of Trypanosoma cruzi and early association with endosomal/lysosomal compartments*. Cell Microbiol, 2004. **6**(9): p. 829-38.

69. Procopio, D.O., et al., *Trypanosoma cruzi*: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. *Exp Parasitol*, 1998. **90**(1): p. 1-13.
70. Fernandes, M.C., et al., *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med*, 2011. **208**(5): p. 909-21.
71. Schenkman, S. and R.A. Mortara, *HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by Trypanosoma cruzi trypomastigotes*. *J Cell Sci*, 1992. **101 (Pt 4)**: p. 895-905.
72. Fernandes, M.C., et al., *Trypanosoma cruzi trypomastigotes induce cytoskeleton modifications during HeLa cell invasion*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011. **106**(8): p. 1014-6.
73. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 335-76.
74. Barton, G.M. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(3): p. 380-3.
75. McConville, M.J. and M.A. Ferguson, *The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes*. *Biochem J*, 1993. **294 (Pt 2)**: p. 305-24.
76. Kayama, H. and K. Takeda, *The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection*. *Microbes Infect*, 2010 **12**(7): p. 511-7.
77. Carreira, J.C., et al., *Structural variation in the glycoinositolphospholipids of different strains of Trypanosoma cruzi*. *Glycoconj J*, 1996. **13**(6): p. 955-66.
78. Previato, J.O., et al., *Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(5): p. 2518-26.
79. Previato, J.O., et al., *Glycoinositolphospholipid from Trypanosoma cruzi: structure, biosynthesis and immunobiology*. *Adv Parasitol*, 2004. **56**: p. 1-41.
80. Campos, M.A., et al., *Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite*. *J Immunol*, 2001. **167**(1): p. 416-23.
81. Oliveira, A.C., et al., *Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi*. *J Immunol*, 2004. **173**(9): p. 5688-96.
82. Campos, M.A., et al., *Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88*. *J Immunol*, 2004. **172**(3): p. 1711-8.
83. Bafica, A., et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection*. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 3515-9.
84. Koga, R., et al., *TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7059-66.
85. Caetano, B.C., et al., *Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 2011. **187**(4): p. 1903-11.
86. Chessler, A.D., et al., *A novel IFN regulatory factor 3-dependent pathway activated by trypanosomes triggers IFN-beta in macrophages and fibroblasts*. *J Immunol*, 2008. **181**(11): p. 7917-24.
87. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. *J Mol Biol*, 1975. **98**(3): p. 503-17.
88. Schena, M., et al., *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray*. *Science*, 1995. **270**(5235): p. 467-70.
89. Kamada, Y., et al., *Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis*. *Int J Hematol*, 2012. **96**(4): p. 492-500.
90. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(9): p. 5116-21.

91. storey, J.D., *A direct approach to false discovery rates*. Journal of the Roayl Statistical Society, 2002. **64**(series B): p. 479-498.
92. Grynberg, P., et al., *Trypanosoma cruzi gene expression in response to gamma radiation*. PLoS One, 2011. **7**(1): p. e29596.
93. Bombeiro, A.L., et al., *IL-12p40 deficiency leads to uncontrolled Trypanosoma cruzi dissemination in the spinal cord resulting in neuronal death and motor dysfunction*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49022.
94. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
95. Wang, Y., et al., *Gene network revealed involvements of Birc2, Birc3 and Tnfrsf1a in anti-apoptosis of injured peripheral nerves*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e43436.
96. Nomura, T., et al., *Targeting the Vav3 oncogene enhances docetaxel-induced apoptosis through the inhibition of androgen receptor phosphorylation in LNCaP prostate cancer cells under chronic hypoxia*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 27.
97. Shigihara, T., et al., *Transcriptome profile of Trypanosoma cruzi-infected cells: simultaneous up- and down-regulation of proliferation inhibitors and promoters*. Parasitol Res, 2008. **102**(4): p. 715-22.
98. Manque, P.A., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes*. Infect Immun, 2011. **79**(5): p. 1855-62.
99. Gao, W. and M. Pereira, *Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol, 2002(32): p. 167-170.
100. Ponce, N.E., et al., *Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, modulates interleukin-6-induced STAT3 phosphorylation via gp130 cleavage in different host cells*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1832**(3): p. 485-94.
101. Eickhoff, C.S., L. Eckmann, and D.F. Hoft, *Differential interleukin-8 and nitric oxide production in epithelial cells induced by mucosally invasive and noninvasive Trypanosoma cruzi trypomastigotes*. Infect Immun, 2003. **71**(9): p. 5394-7.
102. Schwertschlag, U.S., et al., *Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11*. Leukemia, 1999. **13**(9): p. 1307-15.
103. Maeshima, K., et al., *A protective role of interleukin 11 on hepatic injury in acute endotoxemia*. Shock, 2004. **21**(2): p. 134-8.
104. D'Mello, V. and R.B. Birge, *Regeneration after death: Vav3 to the rescue*. Blood, 2009. **113**(21): p. 5037-8.

ANEXO

A1. Cebadores diseñados para realizar RT-PCR en tiempo real.

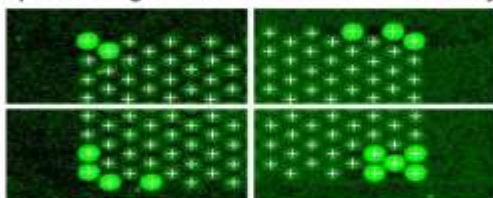
Gen	Secuencia 5'-3'	Pb de producto	Tm/Tm de IDT	Exon junction
IL-8 Forward	CACCGGAAGGAACCATCTCA	110	51.39/56.8	sí
IL-8 Reverse	TGGCAAAACTGCACCTTCACA		61.23/57.9	
IL-1 α Forward	TCACGGCTGCTGCATTACAT	179	60.39/57.3	sí
IL-1 α Reverse	GGGTATCTCAGGCATCTCCTTC		59.7/56.7	
IL-6 Forward	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC	193	59.97/57.2	sí
IL-6 Reverse	TACATGTCTCCTTTCTCAGGGC		59.50/56.3	
BIRC 3 Forward	GGCAGCAGGTTTACAAAGGAG	143	59.46/56.3	sí
BIRC 3 Reverse	ACCCATGCACAAAACCTACCTC		58.49/55.3	
NFKB1 Forward	TGCACTTGGCCATCATCCAT	190	60.3	no
NFKB1 Reverse	TCTCGGAGCTCAGGATCACA		60.3	
CXCL2 Forward	ACGGCAGGGAAATGTATGTGT	231	60.00/56.8	no
CXCL2 Reverse	TCGAAACCTCTCTGCTCTAACA		58.85/55.4	
CXXC4 Forward	GCTCATCAACTGTGGCGTCT	120	60.67	sí
CXXC4 Reverse	GGTGTCTCTCTAGTGAAGTGC		58.42	
PRR15 Forward	TTAAGCCCGAGCAGCACAG	222	60.38	sí
PRR15 Reverse	TCTGCTGTTGGTGAGCGATT		59.96	
PRKCB Forward	CAAAAGCTTGTGGGCGAAAT	227	59.21	sí
PRKCB Reverse	CACCACAATAGCCGTTGAGC		59.55	

A2. Reporte de Control de Calidad de Agilent Technologies

QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene Expression

Date	Friday, March 22, 2013 - 12:15	Grid	014850_D_F_20120130
Image	US45103120_251485009544_S01_H[1_1]	BG Method	No Background
Protocol	GE1_1105_Oct12 (Read Only)	Background Detrend	On(FeatNCRRange, LoPass)
User Name	ggreif	Multiplicative Detrend	True
FE Version	11.5.1.1	Additive Error	11(Green)
Sample(red/green)		Saturation Value	628761 (g)

Spot Finding of the Four Corners of the Array



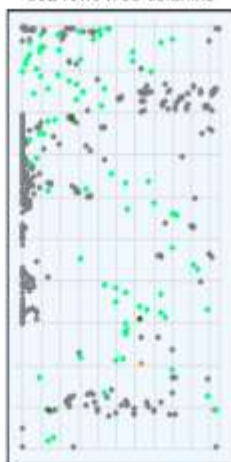
Grid Normal

Feature	Green	Local Background	Green
---------	-------	------------------	-------

Non Uniform	3	13
Population	78	404

Spatial Distribution of All Outliers on the Array

532 rows x 85 columns



FeatureNonUnif (Green) = 3(0.01%)

GeneNonUnif (Green) = 3 (0.007 %)

*BG NonUniform	*BG Population
*Green FeaturePopulation	*Green Feature NonUniform

Net Signal Statistics

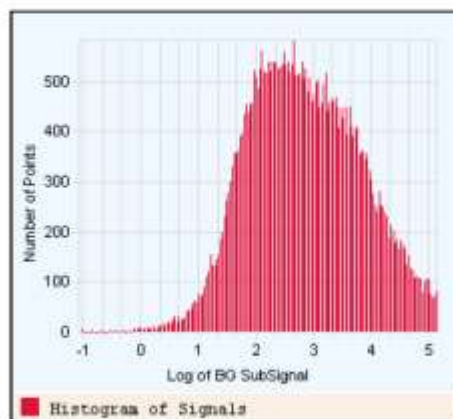
Agilent SpikeIns: Green

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	200590
50% of Sig. Distrib.	915
1% of Sig. Distrib.	194

Non-Control probes: Green

# Saturated Features	2
99% of Sig. Distrib.	156162
50% of Sig. Distrib.	725
1% of Sig. Distrib.	188

Histogram of Signals Plot



Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 998 (Green)

Negative Control Stats

Green

Average Net Signals	217.36
StdDev Net Signals	30.30
Average BG Sub Signal	-12.93
StdDev BG Sub Signal	10.25

Local Bkg (inliers)

Green

Number	44610
Avg	84.65
SD	4.91

Foreground Surface Fit

Green

RMS_Fit	28.79
RMS_Resid	11.49
Avg_Fit	257.12

Multiplicative Surface Fit

Green

RMS_Fit	0.12
---------	------

Reproducibility: %CV for Replicated Probes

Median %CV Signal (inliers)

Non-Control probes

Agilent SpikeIns

Green

Green

BGSubSignal	16.22	19.76
ProcessedSignal	8.17	14.40

Spatial Distribution of Median Signals for each Row

