



---

**Puesta a punto y establecimiento de cultivo *in vitro* de amastigotas axénicos de *Trypanosoma cruzi* como posible modelo de estudio de amastigotas celulares**

---



Lucía Bilbao

Tutora: Leticia Pérez

Co-tutor: Pablo Smircich

Tesis de grado

Licenciatura en Bioquímica  
Laboratorio de Interacciones Moleculares  
2018

## Índice

Índice .....	2
1. Abreviaturas.....	4
2. Resumen .....	5
3. Introducción.....	6
3.1 Introducción .....	6
3.1.1 Enfermedad de Chagas.....	6
3.1.2 Epidemiología.....	7
3.1.3 Generalidades de <i>T. cruzi</i> .....	9
3.1.4 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	10
3.1.5 Particularidades celulares y de biología molecular de <i>T. cruzi</i> .....	12
3.1.6 Moléculas de superficie de <i>T. cruzi</i> y su interacción con el huésped.....	16
4. Antecedentes y objetivos .....	20
4.1 Antecedentes .....	20
4.2 Objetivo general .....	20
4.3 Objetivos específicos .....	21
5. Materiales y métodos.....	22
5.1 Medios de cultivo y soluciones utilizadas.....	22
5.2 Infección de células de mamífero con epimastigotas.....	22
5.2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de epimastigotas .....	22
5.2.2 Cultivo de células de mamífero .....	22
5.2.3 Infección de células de mamífero con epimastigotas.....	23
5.3 Infección de células de mamífero con tripomastigotas celulares.....	23
5.3.1 Extracción y purificación de tripomastigotas celulares .....	23
5.3.2 Infección de células de mamífero con tripomastigotas celulares.....	23
5.3.3 Tinción con DAPI .....	23
5.4 Cultivo y producción de amastigotas.....	24
5.4.1 Obtención y purificación de amastigotas axénicos ( <i>in vitro</i> ) .....	24
5.4.2 Extracción de amastigotas intracelulares .....	24
5.5 Extracción y cuantificación de ARN en los distintos estadios .....	24
5.6 Análisis de expresión diferencial de genes .....	25

5.6.1 Retrotranscripción del ARN mensajero .....	25
5.6.2 PCR en tiempo real .....	25
5.6.3 Evaluación de la eficiencia de los cebadores utilizados.....	26
5.7 Análisis morfológico de los distintos estadios .....	26
<b>6. Resultados y discusión .....</b>	<b>28</b>
6.1 Puesta a punto de la infección con <i>T. cruzi</i> .....	28
6.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> de epimastigotas .....	28
6.1.2 Obtención de una Infección primaria a partir de epimastigotas estresados nutricionalmente .....	29
6.1.3 Establecimiento de Infección con tripomastigotas celulares .....	30
6.2 Obtención de amastigotas axénicos y celulares .....	32
6.3 Análisis comparativo de expresión diferencial de genes .....	34
6.4 Análisis morfológico de los distintos estadios .....	41
<b>7. Conclusiones y perspectivas .....</b>	<b>43</b>
7.1 Conclusiones .....	43
7.2 Perspectivas .....	43
<b>8. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>44</b>

## 1. Abreviaturas

°C	Grado Celsius
μL	Microlitros
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
μg	Microgramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNsa	Desoxirribonucleasa
PBS	Tampón salino de fosfato
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dNTP	Desoxinucleósido -5' - trifosfato
g	Aceleración de la gravedad terrestre
SFB	Suero fetal bovino
BHI	Brain-Heart Infusion
PFA	Paraformaldeído
GPI	Glucosilfosfatidil inositol
hs	Horas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
pb	Pares de bases
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5) -trifosfato

## 2. Resumen

*Typanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el protozoo causante de la enfermedad de Chagas, patología que afecta a millones de personas alrededor del mundo, no solo en el centro y sur de América, sino que también, debido a las corrientes migratorias se ha extendido a otras regiones como Canadá, EEUU y España, constituyendo de esta manera un serio problema sanitario y económico. El parásito atraviesa un ciclo de vida bastante complejo, el cual involucra un insecto triatomino, hematófago que funciona como vector, y un hospedero vertebrado. Presenta al menos cuatro estadios principales bien diferenciados relacionados a los distintos entornos a los que se enfrenta. La forma amastigota se encuentra en las células del hospedero mamífero, siendo la única forma intracelular, así como replicativa en este organismo. La misma se encuentra en estrecho contacto con el hospedero vertebrado siendo esencial para la proliferación y mantenimiento del parásito dentro del mismo. Sin embargo, a pesar de su relevancia biológica, estas formas han sido poco exploradas, dirigiendo la mayor parte de las investigaciones hacia una aproximación *in vitro* de las formas epimastigotas del parásito. No obstante, muchas veces el uso de este último como modelo de estudio no alcanza para contestar determinadas preguntas biológicas. Por otro lado, dado que aún se conoce poco de los factores que desencadenan la amastigogénesis primaria, existe cierta controversia en cuanto a la validez de los amastigotas axénicos (obtenidos en cultivo *in-vitro* fuera de células de mamífero) como un modelo representativo de amastigotas intracelulares. En este trabajo se puso a punto y se estableció una infección de *T. cruzi* en células de mamífero. Se extrajeron amastigotas intracelulares, así como también se generó un cultivo *in vitro* de amastigotas axénicos. Con el fin de realizar un análisis comparativo entre ambos modelos, se evaluó la expresión diferencial de proteínas de superficie para distintos genes por qPCR. Se encontró proteínas diferencialmente expresadas pertenecientes a este grupo tanto en amastigotas axénicos como amastigotas celulares. Asimismo, se logró comparar morfológicamente ambos modelos por *Microscopia Electrónica de Barrido*, hallándose así notables similitudes microscópicas. Con estos resultados se intentó aportar datos relevantes hacia un tema que genera polémica dentro de la comunidad.

### 3. Introducción

#### 3.1 Introducción

##### 3.1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad lleva el nombre del médico e investigador brasileño que la descubrió en 1909, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (WHO, 2018).

Presenta **dos fases claramente diferenciadas**. Una fase inicial o aguda que dura entre 4 y 8 semanas, y una fase crónica que persiste durante toda la vida del huésped. La fase aguda presenta parásitos circulantes en la sangre y es usualmente asintomática o puede presentar leves síntomas no específicos, probablemente debido a que la carga parasitaria aun es leve. Entre los síntomas, los que más se destacan son dolores de cabeza, edema en las extremidades inferiores o en la cara, dolor abdominal y/o torácico, erupción cutánea, diarrea, miocarditis y más raramente meningoencefalitis. Sin embargo, hasta un **70% de los casos nunca desarrollara manifestaciones clínicas** de esta naturaleza. El tratamiento para esta enfermedad es difícil y es recomendado únicamente para pacientes con infección aguda. La utilización de drogas antiparasitarias en este estadio puede curar la infección y prevenir manifestaciones crónicas. Los únicos medicamentos disponibles son benznidazol y nifurtimox, que producen efectos secundarios graves. Los datos son escasos en cuanto a la efectividad del medicamento para pacientes con infecciones crónicas. Las manifestaciones clínicas en la **fase aguda de la enfermedad se resuelven espontáneamente en un 90%** de los pacientes infectados, incluso si estos no fueron tratados (Rassi Jr, 2010). Los pacientes que no desarrollaron síntomas tienen la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica, que es definida por la presencia de la infección y confirmada a través de pruebas serológicas y/o parasitarias. La mayor parte de la población infectada en áreas endémicas se encuentran dentro de esta fase indeterminada de la enfermedad (Nunes, et al., 2013). Aproximadamente **un tercio de los pacientes** progresan desde dicha fase hacia una fase determinada en la cual surgen síntomas y signos crónicos (Malik, et al., 2015). Las presentaciones clínicas de esta fase involucran **patologías en órganos específicos**,

especialmente el corazón, el esófago o el colon, que están agrupados en tres formas principales de la enfermedad: cardíaca, digestiva o cardio-digestiva (Nunes, et al., 2013). Durante el transcurso de la misma, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas e incluso mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita por arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca progresiva por destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones (WHO, 2018).

La fase crónica dura toda la vida del individuo y resulta en una disminución en su esperanza de vida (Nunes, et al., 2013). El equilibrio entre la contención inmunológica mediada por el parásito y el daño provocado en los tejidos del huésped a causa de la inflamación, probablemente determinan el curso de la enfermedad (Rassi Jr, 2010).

### 3.1.2 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es la enfermedad más frecuente de las enfermedades tropicales transmisibles en América Latina. Datos de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO) calculan que en el mundo hay cerca de 8 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, el parásito causante de esta enfermedad. Se encuentra sobre todo en zonas endémicas, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces u orina de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con muchos otros nombres, según la zona geográfica. Esta patología ha sido clasificada dentro del grupo de enfermedades desatendidas debido a la baja inversión histórica por parte de la industria farmacéutica (WHO, 2018).

Existe un promedio de aproximadamente 10.000 muertes anuales por complicaciones en las fases aguda y crónica de la enfermedad. Incluso los números coinciden en que provoca más muertes por año que cualquier otra enfermedad transmitida por parásitos incluyendo la malaria (Moloney, 2009). Se estima además, que alrededor de 100 millones de personas en las Américas viven en áreas de exposición y están en riesgo continuo de contraer la enfermedad. Está reportado que la incidencia anual es de casi 56.000 casos (PAHO, 2018). La enfermedad de Chagas se encuentra

principalmente en la parte continental de América Latina (y no en las islas del Caribe), pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental (WHO, 2018).

El principal mecanismo de transmisión es vectorial, por hemípteros (chinches), de la Subfamilia Triatominae (con alimentación hematófaga). Estos insectos pueden vivir en las grietas y en las ranuras de viviendas mal construidas en las zonas rurales o suburbanas. Normalmente se esconden durante el día y se vuelven activos durante la noche, cuando se alimentan de sangre, incluso humana. Por lo general pican una zona expuesta de la piel o mucosas (labios, conjuntiva, etc.), y el insecto defeca cerca de la picadura. Los parásitos entran en el cuerpo cuando la persona instintivamente rasca las heces del insecto en la picadura, y contamina los ojos, la boca, o en cualquier lesión que comprometa la integridad de la piel. Otras modalidades de transmisión son transfusional, congénita, trasplantes de órganos u oral (PAHO, 2018). A pesar de que han sido identificadas 140 especies de triatominos (Schofield, 2009), solamente algunos son vectores competentes para *T. cruzi*; particularmente *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* son los vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre (WHO, 2002). Estos vectores se encuentran desigualmente distribuidos por el Sur de América, por lo que cada región posee un vector principal de la enfermedad: en el Cono Sur es *Triatoma infestans*, en Centroamérica *Rhodnius prolixus*, mientras que *Triatoma dimidiata* se encuentra diseminado desde el centro de México hasta Panamá, registrándose también focos en ciertos lugares de Colombia, Venezuela, Ecuador y el norte de Perú (Cerecetto, 2012).

Actualmente no existe vacuna contra la enfermedad de Chagas. El control integrado de vectores es el método más eficaz de prevenir la enfermedad. El cribado de la sangre donada es necesario para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y donación de órganos. Resulta ser una enfermedad muy difícil de erradicarse, debido al gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a este parásito en las Américas. Por esta razón es que todos los esfuerzos son dirigidos hacia el control continuo y prevención de la transmisión, así como también lograr que la población infectada y enferma tenga acceso temprano a la asistencia sanitaria (WHO, 2018). En el año 1991 la

Organización Mundial de la Salud, con el fin de disminuir la transmisión vectorial y transfusional, lideró un plan para eliminar el vector de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas. Estas acciones de control permitieron que Uruguay se encuentre actualmente en un estado avanzado de control vectorial, con interrupción de la transmisión, certificada desde 1997 (OPS, 2004).

### 3.1.3 Generalidades de *T. cruzi*

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un **protista** perteneciente a la Clase *Zoomastigophora*, Orden *Kinetoplastidiae*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma* y Subgénero *Schizotrypanuma*. Su clasificación taxonómica constituye una **población muy heterogénea** que consiste en un **gran número de cepas con diferentes características** en relación a distintas propiedades como la tasa de crecimiento, virulencia, perfil antigénico, patogenicidad, tropismo y sensibilidad a drogas antichagásicas.

El ciclo de vida del parásito alterna entre formas no infectivas e infectivas. Epimastigota y amastigota son formas replicativas en el intestino del vector hematófago y dentro de la célula de mamífero, respectivamente. La etapa tripomastigota es infectiva pero no replicativa y también puede encontrarse en dos etapas de diferenciación diferentes: los tripomastigotas sanguíneos, que se encuentran en la sangre de los vertebrados hospedero y los tripomastigotas metacíclicos, que se encuentran en el recto del insecto vector (Buscaglia, 2003; Pech-Canul, et al., 2017). Los distintos estadios han sido definidos inicialmente en base a sus características morfológicas que implican cambios a nivel celular en los que se incluyen cambios en composición de superficie, así como cambios en el metabolismo. Mientras que epimastigotas son altamente activos en vías relacionadas al catabolismo y anabolismo, los tripomastigotas presentan bajos niveles de transcripción y traducción, especialmente en adherencia e infección celular. Por otro lado, aunque los amastigotas sean metabólicamente más activos que los tripomastigotas, no tienen la versatilidad de respuesta frente a diferentes situaciones nutricionales (Berna, et al., 2017).

*T. cruzi* es un **organismo unicelular** que presenta diferencias en los procesos nucleares en comparación con otros eucariotas. Sin embargo, su núcleo presenta una

organización estructural semejante al de una típica célula eucariotas. El mismo tiene una longitud de aproximadamente 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contiene un nucléolo centralizado en epimastigotas (Schenkman, et al., 2011). En amastigotas el núcleo se muestra de forma esférica y también presenta un nucléolo central. Cuando el mismo es comparado con los tripomastigotas metacíclicos se observan claras diferencias, aparece una especie de organelo elongado con alto contenido de heterocromatina y carente de nucléolo. Presenta una membrana nuclear típica provista de poros y la cromatina condensada dispersa a lo largo del nucleoplasma (Elias, et al., 2001).

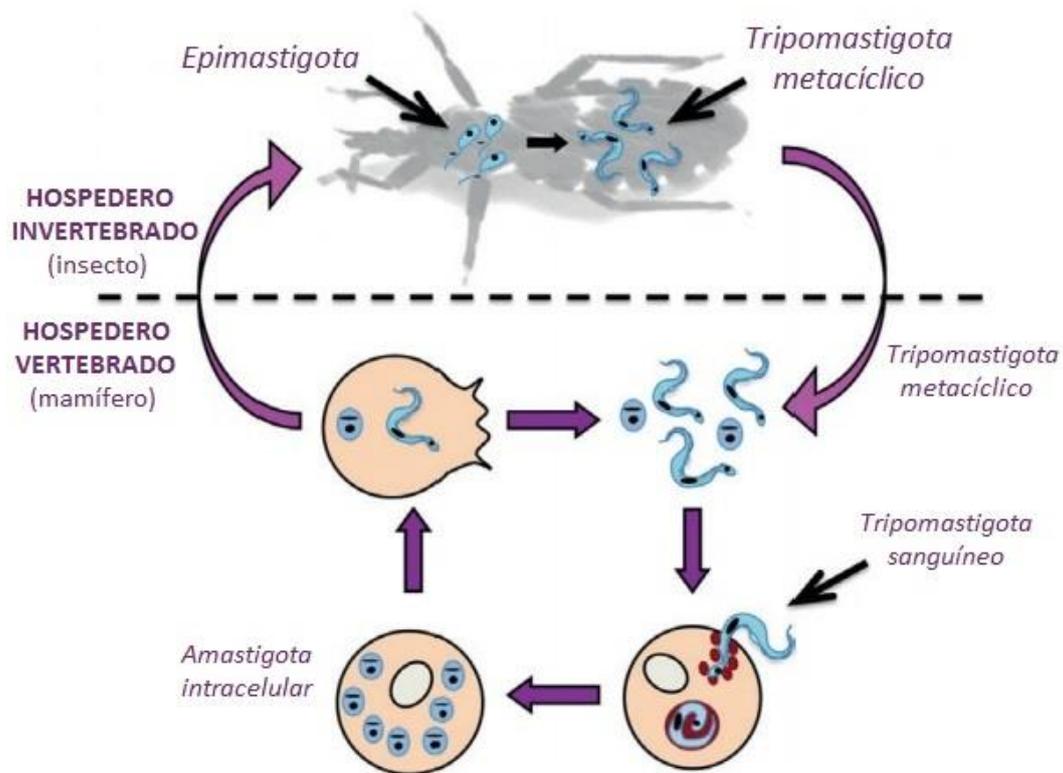
Además, posee una mitocondria única que se extiende a lo largo del cuerpo celular. La matriz mitocondrial posee una región especializada formada por ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial, denominado kinetoplasto, el cual puede llegar a representar hasta el 25% del ADN total del parásito (Hoffmann, 2016; Shapiro and Englund, 1995). *T. cruzi* presenta un flagelo responsable de su movilidad. En las formas epimastigota y tripomastigota el flagelo esta adherido al cuerpo del parásito. También puede observarse en amastigotas, pero el mismo tiene un tamaño muy corto. El flagelo muestra un arreglo típico de nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central.

#### 3.1.4 Ciclo de vida de *T. cruzi*

*T. cruzi* presenta un ciclo de vida complejo que involucra varias etapas de desarrollo alternando entre hospederos vertebrados e invertebrados (Souza, 2009). Entre estos estadios se encuentran formas de vida replicativas y no replicativas, así como también formas infectivas y no infectivas. Las formas amastigotas y tripomastigotas sanguíneos se encuentran en el hospedero mamífero, mientras que en el insecto vector se desarrollan las formas epimastigota y tripomastigota metacíclico (De Carvalho, 1986).

El ciclo de vida comienza cuando el insecto vector ingiere tripomastigotas sanguíneos presentes en la sangre del hospedero mamífero infectado. Una vez ingeridos, la mayoría de los tripomastigotas mueren en el estómago del insecto, aquellos que logran sobrevivir luego de unos días se transforman a la forma epimastigota no infectiva. Estos migran hacia el intestino donde comienzan a dividirse intensamente. En las regiones más posteriores del intestino delgado y el recto del vector, tiene lugar una

nueva diferenciación (metaciclogénesis), donde los epimastigotas se transforman en tripomastigotas metacíclicos infectivos no proliferativos. Estos tripomastigotas metacíclicos se liberan junto con las heces del insecto cuando el insecto vuelve a alimentarse con sangre de un nuevo mamífero no infectado pudiendo llegar al torrente sanguíneo del mismo a través de la herida causada o a través de mucosas. En el torrente sanguíneo del nuevo hospedero infectado, los tripomastigotas metacíclicos pueden ser ingeridos por macrófagos pudiendo infectar además fibras cardíacas y de músculo liso. Los tripomastigotas penetran en la célula hospedera. Una vez en el mamífero, los tripomastigotas se internalizan en las células en vacuolas endocíticas conocidas como **vacuolas parasitóforas**. Luego de la acidificación del medio, los tripomastigotas se van diferenciando en amastigotas a la vez que se liberan en el citoplasma de la célula luego de romper la vacuola. Los amastigotas intracelulares proliferan activamente en el citoplasma y después de varias rondas de replicación, cuando se llega a un **número crítico de parásitos intracelulares** los amastigotas se diferencian en tripomastigotas sanguíneos y ocurre la lisis celular. Los tripomastigotas sanguíneos pueden infectar a otras células o alcanzar el sistema circulatorio pudiendo ser ingeridos por un insecto vector, completando el ciclo (de Souza, et al., 2010) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *T. cruzi*. Los tripomastigotas metacíclicos derivados de epimastigotas en el insecto vector son transmitidos al hospedero mamífero a través de sus heces. Una vez dentro del mamífero, invaden sus células y son rápidamente dirigidos hacia la vacuola parasitófora. Dentro de las vacuolas comienza su transformación hacia la forma amastigota (2-8 hs), luego ésta se rompe y los parásitos se localizan en el citoplasma (8-16 hs). Los amastigotas intracelulares comienzan a dividirse 24 hs post infección, y continúan replicándose cada 12 hs durante 5-6 días. Finalmente, se diferencian hacia tripomastigotas y rompen la célula liberándose a la circulación del hospedero y diseminando la infección. Extraído y modificado de (Caradonna and Burleigh, 2011).

### 3.1.5 Particularidades celulares y de biología molecular de *T. cruzi*

Tal como se comentó previamente *T. cruzi* es un organismo unicelular que presenta al menos **cuatro estadios bien diferenciados:** epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, tripomastigotas sanguíneos y amastigotas (Caradonna and Burleigh, 2011). Durante el proceso de transición de un estadio al otro, el parásito exhibe cambios en el metabolismo y modificaciones profundas en morfología en cuanto al tamaño y forma celular, posición de núcleo y kinetoplasto así como la longitud del flagelo.

En principio los epimastigotas tienen un tamaño que oscila entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de largo, pero a medida que viajan por el intestino del insecto crecen y aumentan 10  $\mu\text{m}$

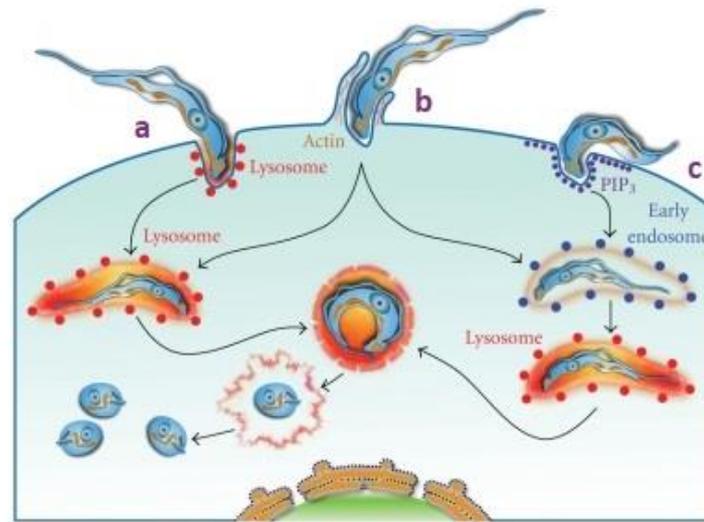
en longitud. Allí es donde se diferencian a tripomastigotas metacíclicos. Los epimastigotas tienen un flagelo anclado cerca del centro del cuerpo del parásito y el kinetoplasto con formas de disco tiene una ubicación anterior al núcleo. Los tripomastigotas metacíclicos miden aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de largo y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y tienen el núcleo cercano a la parte posterior de su cuerpo. En este caso el kinetoplasto se ubica posterior al núcleo. Tienen además, un flagelo libre anclado a una membrana ondulante en el cuerpo. Si bien, desde el punto de vista parasitológico los tripomastigotas metacíclicos y los sanguíneos son casi indistinguibles morfológicamente y parecen compartir las mismas propiedades biológicas pues son capaces de interactuar e invadir la célula hospedera, existen diferencias a nivel de su biología molecular que permiten su identificación. Las formas metacíclicas y las formas sanguíneas presentan antígenos específicos presentando además modos diferentes de interactuar con el hospedero. Los últimos están expuestos a las moléculas efectoras del sistema inmune del hospedero mamífero, incluyendo anticuerpos específicos. Estas formas celulares expresan en su superficie múltiples miembros de una gran familia de moléculas, las más caracterizadas son las mucinas y las transalidasas, asociadas a protección y evasión del sistema inmune del hospedero (Burleigh and Andrews, 1995; De Pablos and Osuna, 2012; Navarro, et al., 2003).

Los primeros pasos del proceso de interacción entre *T. cruzi* y la célula hospedera se pueden dividir en tres etapas: adhesión y reconocimiento, señalización e invasión (de Souza, et al., 2010).

En el paso de adhesión está implicado el reconocimiento de moléculas presentes en la superficie de las células del parásito como diversas glicoproteínas y distintas proteasas, y del huésped en las que se destacan moléculas similares a lectinas, residuos de carbohidratos y distintas integrinas que funcionan como receptores (de Souza, et al., 2010) (Figura 3).

Después de la unión y el reconocimiento del parásito por la superficie de la célula huésped, tiene lugar una serie de procesos de señalización celular que culminan en la invasión del parásito en la célula hospedera (de Souza, et al., 2010)(Figura 2). En los momentos iniciales del reconocimiento, tanto en el parásito como en la célula

hospedera, se produce un aumento transitorio de los niveles citoplasmáticos de calcio (Yoshida, 2008) (Garzoni, et al., 2003).



**Figura 2** Modelo de la invasión de *T. cruzi*. El modelo indica tres mecanismos distintos de entrada del parásito en la célula huésped. (a) la ruta dependiente de lisosomas se inicia por la endocitosis regulada por  $Ca^{2+}$  de los lisosomas en la membrana plasmática; (b) en la vía dependiente de la actina, los tripomastigotas penetran en una célula huésped a través de la **expansión de la membrana plasmática** que culmina en el ensamblaje de una vacuola; (c) en la vía independiente de lisosomas, los parásitos entran en las células a través de la invaginación de la membrana plasmática que acumulan PIP<sub>3</sub> (producto de la activación de PI3K de clase I). Finalmente, la forma del tripomastigota se transforma gradualmente en una forma amastigota con lisis simultánea de la membrana de la vacuola parasitadora. Entonces, las amastigotas en contacto directo con el citoplasma comienzan a dividirse. Extraído y modificado de (de Souza, et al., 2010).

La vía dependiente de los lisosomas se inicia mediante la exocitosis regulada por  $Ca^{2+}$  dirigida de los lisosomas en la membrana plasmática. Otra vía utilizada para la internalización del parásito en las células no fagocíticas es la **vía independiente del lisosoma**. En este modelo, los parásitos ingresan a las células a través de la invaginación de la membrana plasmática que **acumulan PIP<sub>3</sub>**, el principal producto de la activación de PI3K de clase I (de Souza, et al., 2010).

En otro mecanismo conocido como endocitosis, se produce la participación de los **filamentos de actina presentes**. Se ha demostrado que los aumentos transitorios de calcio en el citoplasma de la célula huésped, después de la interacción con tripomastigota, causan una reorganización del citoesqueleto de actina. Además, la

despolimerización de los filamentos de actina en el sitio de entrada del parásito puede potenciar la invasión del parásito (Woolsey and Burleigh, 2004).

Los **amastigotas** a diferencia del resto de los estadios, presentan un tamaño mucho menor, alcanzan un valor máximo entre **1,5 y 5  $\mu\text{m}$  de largo**. Además, son intracelulares y no tienen un flagelo protuberante. Poseen una forma redondeada u oval y su kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo.

La amastigogénesis ocurre en una primera instancia cuando los tripomastigotas metacíclicos de las heces de triatomíneos se diferencian en amastigotas dentro de las células de los mamíferos, y un proceso secundario cuando los tripomastigotas derivados del tejido infectado invaden nuevas células y se diferencian nuevamente a amastigotas (Navarro, et al., 2003). Usando condiciones axénicas, varios investigadores han logrado obtener amastigotas en cultivo axénico a partir de tripomastigotas celulares (Contreras, et al., 2002).

**CL Brener** fue la cepa elegida como referencia para el proyecto genómico de *T. cruzi*, publicado en 2005. Se calculó que el genoma estaba compuesto por 12.000 genes, y que el 50% del mismo correspondía a secuencias repetidas, mayoritariamente grandes familias mutagénicas y retrotrasposones (El-Sayed, et al., 2005; Pech-Canul, et al., 2017).

*T. cruzi* presenta procesos particulares que lo diferencian del resto de los eucariotas. Tanto su transcripción, así como la estructura nuclear y organización de la cromatina presenta características muy peculiares (Schenkman, et al., 2011). El **genoma** de los tripanosomátidos está organizado en grupos de genes codificantes para proteínas ubicados en *tandem* en la misma cadena de ADN, separados por regiones intergénicas relativamente cortas (Martínez-Calvillo, et al., 2010). Con algunas excepciones, los genes no contienen intrones, y los grupos se transcriben como unidades policistrónicas nucleares largas donde a diferencia de los operones bacterianos, los genes contenidos en el mismo policistrón no necesariamente comparten función relacionada. Esta particular organización aunada al hecho de no haberse encontrado promotores canónicos para la polimerasa II, han llevado a proponer la hipótesis de que la **regulación de la expresión génica estaría dándose exclusivamente a nivel post-transcripcional** (Kramer, 2012). La maduración de mRNAs en tripanosomas implica la adición común de

un ARN de 39 nucleótidos (SL ARN) a todos los ARNm en su extremo 5' en un proceso conocido como *trans-splicing* y poliadenilación en el extremo 3' (Daniels, et al., 2010).

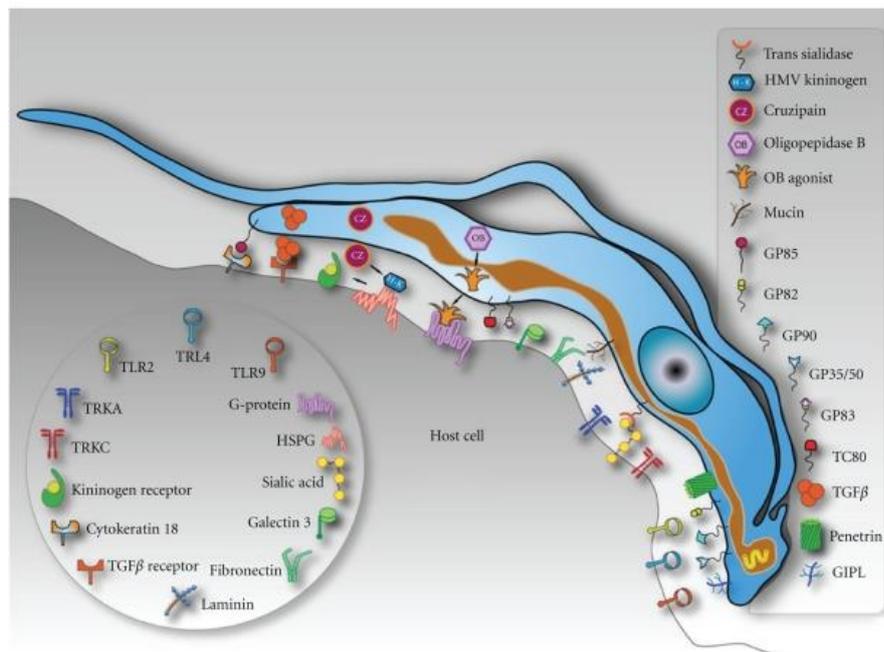
### 3.1.6 Moléculas de superficie de *T. cruzi* y su interacción con el huésped

Con respecto a la superficie celular, *T. cruzi* posee un **denso glycojalix** formado por un gran número de glicoproteínas, cuya mayoría están unidas a la membrana plasmática por **glucosilfosfatidil inositol (GPI)**, que en cierta medida constituye un sello de identidad de estos parásitos (Morita, et al., 2000). Estas proteínas de superficie pertenecen a varias **familias multigénicas**, producto de la **expansión génica** característico en estos parásitos (Berna, et al., 2017). Se ha demostrado que las proteínas de membrana desempeñan un papel **importante en la biología de *T. cruzi***, incluida la interacción entre el parásito y el hospedero, la resistencia al pH bajo y la evasión del sistema inmune del hospedero. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el cuerpo celular, el flagelo y el bolsillo flagelar de las diferentes formas durante desarrollo (Pech-Canul, et al., 2017) e incluyen las superfamilias transialidasas y aquellas similares a las transialidasas (TcS), mucinas (TcMUC) y MASP (proteína de superficie asociada a mucina) (Freitas, et al., 2011) (Figura 3).

*T. cruzi* es incapaz de sintetizar monosacáridos de **ácido siálico**, por lo que se ve obligado a adquirirlo desde el huésped e incorporarlo en moléculas de su propia superficie de membrana. Se demostró que dos grupos de moléculas estaban implicados en este proceso, las TcS y las mucinas TcMUC (Frasch, 2000).

Las **transialidasas** son una de las superfamilias de proteínas de superficie que participa de este mecanismo. Tiene la particularidad que, en lugar de hidrolizar el ácido siálico, puede transferirlo de los sialoglicoconjugados en el hospedero a las terminales en los glicoconjugados del parásito. La función que desempeña la TcS es crucial en la **patogénesis**, porque la unión de ácido siálico a la superficie del parásito permite su **evasión de la activación del complemento** (Giorgi and de Lederkremer, 2011). Es una familia altamente polimórfica, comprende al menos **140 miembros**, de los cuales solo algunos presentan los residuos críticos para la actividad catalítica. Hasta el momento, 4 grupos han sido descritos basados en la similaridad de secuencia y propiedades funcionales. El grupo I contiene TcS activas (TCNA y SAPA) y proteínas TS-epi expresadas

en tripomastigotas y epimastigotas, respectivamente. Las del grupo II comprenden glicoproteínas de superficie gp85 implicadas en la invasión y adherencia en la célula huésped. Dentro del grupo III se destaca FL-160, una proteína completamente reguladora que inhibe las vías alternativa y clásica de activación del complemento. Las TcS IV están compuestas por genes que codifican antígenos de superficie de tripomastigotas cuya función biológica aún se desconoce (Freitas, et al., 2011; Pech-Canul, et al., 2017).



**Figura 3.** Modelo esquemático donde se indican algunas moléculas involucradas en la interacción hospedero-parásito. Tomado de (de Souza, et al., 2010).

Otra función conocida de estas (TcS) glicoproteínas es que se unen a los receptores de la membrana de la célula hospedera, estabilizando así el contacto entre la célula huésped y el parásito, a través de un motivo conservado conocido como FLY. Recientemente, fue demostrado que este motivo alberga patrones muy similares a aquellos con tropismo celulares en enfermedades humanas (Magdesian, et al., 2001).

El segundo grupo de moléculas implicadas en la incorporación del ácido siálico derivado del hospedero comprende glicoproteínas de tipo mucina (TcMUC), que son las principales receptoras del ácido siálico transferido por TS (Frasch, 2000). Las mucinas

son los **componentes más comúnmente expresados** en la superficie de *T. cruzi* y son la tercera familia de genes más ampliamente expandida en el genoma, comprende aproximadamente 863 genes (El-Sayed, et al., 2005). Se trata de glicoproteínas que se encuentran muy O-glicosiladas con restos de azúcares unidos a residuos Ser/Thr. Tienen dos funciones esenciales: proteger al parásito de los mecanismos defensivos tanto del insecto como del hospedero mamífero, modulando así la respuesta inmune a lo largo del ciclo, y permitir la invasión en células y tejidos específicos (Buscaglia, et al., 2006; Pech-Canul, et al., 2017). Esto demuestran que las mucinas son importantes en las interacciones hospedero-parásito y que el ácido siálico de las mismas promueve la **invasión celular** por tripomastigotas en la corriente sanguínea (Franchin, et al., 1997). Además, las MUC podrían tener un papel en la resistencia del tripomastigota a la escisión de C3 convertasas en el complemento del suero humano (Tomlinson and Raper, 1998). Todos estos resultados indican que las mucinas de *T. cruzi* tienen un papel clave en interacciones célula-célula y protección frente a componentes presentes en el ambiente hostil al cual se encuentra sometido el parásito.

Esta superfamilia se divide en dos grandes grupos de genes, TcMUC y TcSMUG. La expresión de las TcMUC se restringe únicamente a los estadios desarrollados dentro del hospedero mamífero. Este grupo a su vez se encuentra dividido en 3 subgrupos de acuerdo al dominio central (TcMUC I – TcMUC II). TcMUC I es el componente principal en la forma amastigota, mientras que TcMUC II es predominante en las membranas lipídicas de tripomastigotas sanguíneos. La segunda subfamilia de mucinas, TcSMUG exhiben una variabilidad interna mucho menor que las otras dos familias, lo que puede explicarse por su expresión durante las etapas biológicas en el vector de insectos, donde están libres de la presión del sistema inmune (Buscaglia, 2003). Estas también se dividen en dos grupos pequeños de proteínas: *small* (S) y *large* (L) de acuerdo al tamaño del mensajero que codifican (Pech-Canul, et al., 2017). El grupo S es el principal aceptor de ácido siálico en la superficie del parásito por las transialidasas y se encuentra en las formas epimastigota y tripomastigota metacíclica. El grupo TcSMUG L, por el contrario, codifica para glicoconjugados de tipo mucina que no aceptan aceptores de ácido siálico y solo están presentes en la superficie epimastigotas (Pech-Canul, et al., 2017).

La familia amastina es otro grupo de glicoproteínas transmembrana, que consiste en proteínas pequeñas de aproximadamente 180 aminoácidos. Se han definido 4 subfamilias en tripanosomátidos en general, de las cuales *T. cruzi* posee dos de ellas:  $\beta$ -amastina y  $\delta$ -amastina. La función biológica exacta de este grupo de proteínas aún se desconoce, pero al ser una proteína que atraviesa la membrana podría estar asociada al tráfico de moléculas (Rochette, et al., 2005). Los niveles de transcripción de  $\delta$ -amastinas se encuentran regulados positivamente en amastigotas en diferentes cepas de *T. cruzi*, mientras que los transcritos de  $\beta$ -amastina son más abundantes en epimastigotas que en amastigotas o tripomastigotas (Pech-Canul, et al., 2017). Estudios recientes han demostrado que  $\delta$ -amastina juega un papel crucial en la diferenciación de *T. cruzi*; por lo tanto, es una molécula clave responsable de la supervivencia del parásito en la etapa intracelular (Cruz, et al., 2012).

## 4. Antecedentes y objetivos

### 4.1 Antecedentes

A pesar de la relevancia biológica que presenta la forma intracelular del parásito, visto que es esencial para la proliferación y mantenimiento de la infección en el hospedero mamífero, la misma ha sido poco estudiada dada las dificultades que reviste obtener dicho estadio en el laboratorio. De hecho, la mayor parte de los esfuerzos de investigación en *T. cruzi* son realizados utilizando como modelo la forma epimastigota del parásito dado que es bastante más accesible cultivar estas formas *in vitro*. Sin embargo, el uso de epimastigotas como modelo de estudio no alcanza para contestar determinadas preguntas biológicas, principalmente relacionado a mecanismos de interacción hospedero-patógeno, dadas las marcadas diferencias no sólo morfológicas sino también bioquímicas. Considerando los problemas involucrados, la utilización de un modelo intracelular sería la elección. Las formas amastigotas intracelulares son difíciles de obtener en el laboratorio debido a que los protocolos de purificación son tediosos, los mismos consumen mucho tiempo y la producción es baja. Para ello se requiere realizar infecciones de células de mamífero creciendo *in vitro* o infectar modelos animales. Si bien se han establecido protocolos a partir de los cuales es posible obtener amastigotas axénicas a partir de tripomastigotas celulares mediante incubación de estos en medio rico a pH ácido, algunos autores dudan de la similitud de estas formas axénicas con las formas celulares. En este trabajo se pretende poner a punto las condiciones para establecer un cultivo *in vitro* de amastigotas axénicas y amastigotas celulares para luego comparar ambas poblaciones y decidir si la forma axénica constituye un modelo de estudio válido del estadio intracelular.

### 4.2 Objetivo general

Poner a punto y establecer una infección de *Trypanosoma cruzi* para poder realizar una caracterización primaria de amastigotas intracelulares en cultivo y amastigotas axénicas. Teniendo en consideración los resultados obtenidos en cuanto a las diferencias encontradas entre ambas formas, definir a nivel molecular la validez de los amastigotas axénicos como posible modelo de estudio para dicho estadio

intracelular. Se espera aportar datos significativos, disponibles así para su uso, en una temática que genera controversia en la comunidad.

### **4.3 Objetivos específicos**

- 1) Puesta a punto y establecimiento de una infección de *T. cruzi* en células de mamífero.
- 2) Obtención y purificación de tripomastigotas celulares de la cepa CL Brener de *T. cruzi*.
- 3) Producción y purificación de amastigotas axénicos a partir de tripomastigotas celulares
- 4) Extracción y purificación de amastigotas intracelulares de la cepa CL Brener de *T. cruzi*.
- 5) Evaluación de la expresión diferencial de proteínas de superficie en los distintos estadios.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Medios de cultivo y soluciones utilizadas

Para el crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* se utilizó el medio de cultivo Brain-Heart Infusion-Tryptose (BHI): 33 g BHI, 3 g triptosa, 4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 g KCl, 0.3 g glucosa, 10 mL hemina, 990 mL H<sub>2</sub>O. La esterilización se realizó por autoclavado durante 20 minutos a 121 °C. Se le adicionó además penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 µg/mL) y 10% de suero fetal bovino (SFB) tratado 15 minutos a 65°C para la inactivación del complemento.

Para el crecimiento de células de mamífero se utilizó medio de cultivo RPMI el cual también se le adicionó además 1% penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 µg/mL) y 10% de SFB tratado 15 minutos a 65°C para la inactivación del complemento (Batista, 2015).

PBS 1X: 0,145 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,0081 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,0015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

### 5.2 Infección de células de mamífero con epimastigotas

#### 5.2.1 Cultivo *in vitro* de epimastigotas

Epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa CL Brener (Zingales, et al., 1997) fueron mantenidos en cultivo en fase exponencial de crecimiento ( $2 \times 10^7$  parásitos/mL). Los cultivos fueron diluidos 1:10 con medio BHI fresco suplementado con 10% de SFB descomplementado y penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100 µg/mL) cada tres días y conservados a 28°C.

#### 5.2.2 Cultivo de células de mamífero

Para el cultivo de células de mamífero, se dispuso de células VERO (línea celular proveniente de fibroblastos de mono) las cuales fueron mantenidas en medio RPMI completo anteriormente descrito, e incubadas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (Batista, 2015). El cultivo en confluencia fue lavado con PBS 1X, tripsinizado, diluido y nuevamente sembrado para su mantenimiento.

### 5.2.3 Infección de células de mamífero con epimastigotas

Para las infecciones se utilizaron células VERO y epimastigotas en fase estacionaria de al menos 20 días. Se dispone de un cultivo de células VERO crecidas en monocapa (50% confluencia) y se las infecta con epimastigotas en una razón de al menos 100 parásitos/célula. Se retira el medio luego de las 24 hs, se lava con PBS y se coloca medio RPMI completo nuevo.

## 5.3 Infección de células de mamífero con tripomastigotas celulares

### 5.3.1 Extracción y purificación de tripomastigotas celulares

Teniendo un cultivo de células VERO previamente infectado con epimastigotas de fase estacionaria, se colecta el sobrenadante 6-7 días post- infección. Su purificación se lleva a cabo por centrifugación a 3.000 g por 15 minutos (Batista, 2015). Se tiene 3 cultivos creciendo en paralelo de manera de obtener luego 3 réplicas biológicas.

### 5.3.2 Infección de células de mamífero con tripomastigotas celulares

Se tiene un cultivo de células VERO crecidas en monocapa, el cual, 24 hs luego de su pasaje, se infectó con tripomastigotas celulares previamente purificados en una razón de al menos 10 parásitos/célula (Batista, 2015). A las 24 hs post-infección, se retira el medio, se lava con PBS 1X y se coloca medio RPMI completo fresco.

### 5.3.3 Tinción con DAPI

Para evaluar la infección, el cultivo de células es lavado 2 veces con PBS 1X. Posteriormente, las células son fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se retira el PFA y se agrega DAPI 1:10 (1 ug/mL metanol) dejándolo actuar 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se retira el DAPI y se lava 2 veces con PBS.

## 5.4 Cultivo y producción de amastigotas

### 5.4.1 Obtención y purificación de amastigotas axénicos (*in vitro*)

Los amastigotas axénicos fueron obtenidos por amastigogenesis *in vitro* (Hernandez-Osorio, et al., 2010). Brevemente, se incuban tripomastigotas celulares en RPMI completo a 37 °C durante 24 hs. Posteriormente, se centrifuga a 3.000 g por 10 minutos y se incuba a 37 °C durante 2 hs. Se resuspende el pellet, conteniendo los amastigotas axénicos purificados en 1 mL de PBS 1X, luego de centrifuga nuevamente a 3.000 g por 10 minutos y se resuspende en 1 mL de Trizol para posterior extracción de ARN. El procedimiento se realiza por triplicado.

### 5.4.2 Extracción de amastigotas intracelulares

Para la extracción de amastigotas intracelulares se dispone de una infección de 3 días (VERO infectadas con tripomastigotas celulares). Se lava el cultivo 2 veces con PBS 1X, se tripsiniza y se provoca la lisis celular por rotura mecánica. Se realizan dos centrifugaciones de 10 minutos cada una, la primera a 800g y la segunda a 3000g, obteniendo con ésta última los amastigotas intracelulares en el pellet (Batista, 2015). El mismo se resuspende en 1 mL de PBS 1X, luego de centrifuga nuevamente en las mismas condiciones y se resuspende en 1 mL de Trizol para posterior extracción de ARN. Para este procedimiento también se partieron de 3 infecciones mantenidas en paralelo, para luego extraer triplicados biológicos.

## 5.5 Extracción y cuantificación de ARN en los distintos estadios

Para la extracción de ARN se siguió el protocolo TRIzol™ Reagent (Invitrogen) indicado por el fabricante, y para las tres muestras (tripomastigotas celulares, amastigotas intracelulares y amastigotas axénicos) se procedió de la misma forma. Brevemente, se tomó una concentración aproximada de  $2 \times 10^7$  parásitos solubilizados en 1 mL de Trizol, provocando así la lisis celular y liberación del contenido citosólico. Se agrega cloroformo separándose la mezcla en dos fases, una orgánica conteniendo las proteínas y, otra acuosa conteniendo el ARN. Se aísla la fase acuosa y se precipita con

isopropanol. Finalmente, el ARN se lavó con etanol 75% y se solubilizó en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La extracción se realizó para 3 muestras biológicas en los 3 modelos celulares.

Para eliminar las trazas de ADN del ARN extraído, que viniesen de la fase intermedia, las muestras fueron tratadas con el kit DNFree (Thermo Fisher Scientific), según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se incubó el ARN con Tampón de ADNsa I y ADNsa II y posteriormente se agregó un inactivador de la enzima, el cual por centrifugación permitió obtener el ARN aislado en la fase acuosa.

La cuantificación del ARN obtenido se realizó mediante medidas de absorbancia a 260 nm en NanoDrop™ Lite Spectrophotometer de *Thermo Scientific*. Para determinar la pureza de las muestras se tuvo en cuenta el cociente  $Abs_{260}/Abs_{280}$ , considerando como pura aquella muestra cuya relación es mayor o igual a 2 por tratarse de ARN. En paralelo las muestras fueron analizadas por un Agilent 2100 Bioanalyzer.

## 5.6 Análisis de expresión diferencial de genes

### 5.6.1 Retrotranscripción del ARN mensajero

La generación del ADN copia (cDNA) se realizó de igual manera para las 3 muestras. La retrotranscripción del ARN se llevó a cabo usando hexámeros al azar como cebadores y a la Superscript II (Life Technologies) como transcriptasa reversa. Brevemente, 5 µg de ARN molde fueron incubados durante 5 minutos a 65 °C con 50 ng de hexámeros al azar, 1 µL de dNTPs 10 mM y agua hasta completar un volumen final de 12 µL. Luego se agregó 4 µL de tampón de reacción 5x First-Strand Buffer para la transcriptasa reversa Superscript II, 2 µL de 0,1 M de DTT y 1 µL RNaseOUT (40 units/µL). Una vez incubado a 25 °C por dos minutos se añadió 1 µL (200 unidades) de la enzima, llegando un volumen final de 20 µL. Nuevamente se incubó a 25 °C por 10 minutos y luego a 42 °C por 50 minutos. La inactivación de la enzima se realizó a 70 °C durante 15 minutos.

### 5.6.2 PCR en tiempo real

Con el objetivo de verificar los genes para proteínas de superficie se realizaron réplicas técnicas de cada uno de las réplicas biológicas para los distintos estadios del parásito. Se emplearon 50 ng/µL como molde para amplificar los genes seleccionados,

utilizando un par de cebadores para cada gen. La evaluación de estos genes se determinó usando SensiFAST SYBR Hi-Rox Kit (Bioline). Dicho kit contiene la sonda fluorescente SYBR Green, hot start DNA polimerasa, el tampón específico y los dNTPs necesarios para la reacción. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 10 µL conteniendo los cebadores en una concentración final de 0,4 µM. El primer paso de la reacción es una incubación a 95°C durante 10 minutos para activar la polimerasa, y luego 40 ciclos a 95°C por 15 segundos para desnaturalizar las hebras seguido de 1 minuto a 60°C para la hibridación de los cebadores. Las reacciones se llevaron a cabo en un StepOnePlus Real-Time PCR System y los datos obtenidos fueron procesados con StepOnePlus™ Software v2.3.

Para el estudio de los resultados obtenidos, se determinaron los valores relativos de ARN. Para dicha cuantificación, se normalizaron los valores contra el gen control de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ( $CT_{gen} - CT_{goi}$ ), y la magnitud del cambio (*fold change*) se expresó como:

$$FC = 2^{-(CT_{gen} - CT_{goi})}$$

### 5.6.3 Evaluación de la eficiencia de los cebadores utilizados

Los cebadores que se utilizaron fueron desarrollados para proteínas de superficie específicas en los distintos estadios del parásito. Como control interno se empleó el gen para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual no presenta variaciones dentro de los distintos estadios. Para la elección de cuáles cebadores a utilizar, se evaluó la eficiencia de los mismos, tomándose como seleccionados aquellos que presentaran una eficiencia superior al 90%.

Se realizó el cálculo de eficiencia para cada par de cebadores a partir de la pendiente del gráfico  $C_T$  vs log concentración donde la eficiencia queda definida como: *Eficiencia* =  $[10^{-(1/pendiente)}] - 1$ . Las concentraciones ensayadas se realizaron por diluciones seriadas y correspondieron a 50, 25, 12,5 y 6,25 ng de cDNA por reacción.

### 5.7 Análisis morfológico de los distintos estadios

Tripomastigotas celulares, epimastigotas, amastigotas axénicos y celulares purificados fueron analizados por *Microscopia Electrónica de Barrido* (MEB). Los

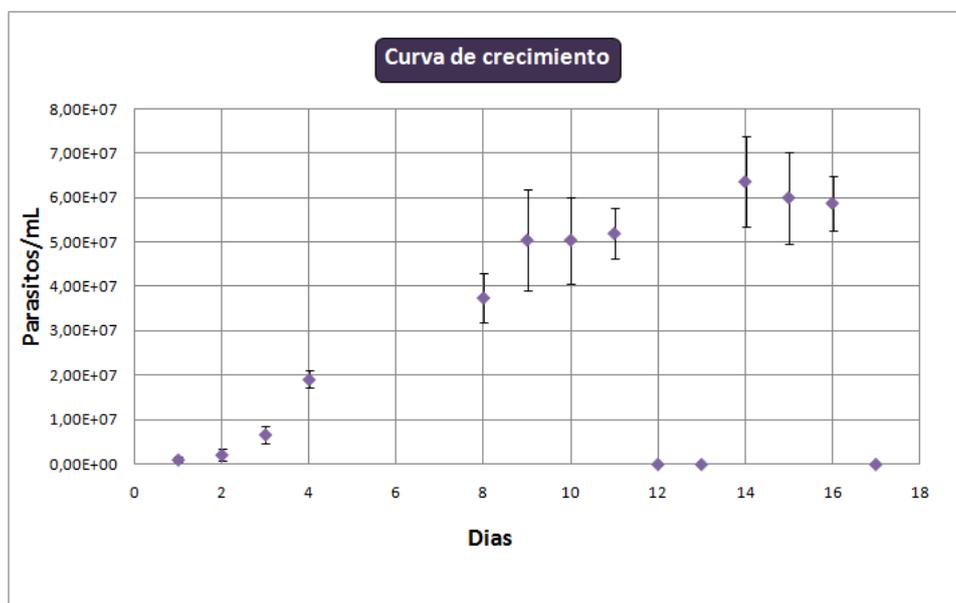
parásitos fueron fijados en 4% paraformaldehído por 15 minutos. Luego de lavados con PBS 1X, se sometieron a deshidratación con concentraciones crecientes de acetona (30-100%) y metalizados con oro en un *Sputter Coater* SCD050/LEICA. Luego de la metalización, las muestras fueron observadas en un microscopio Philips XL30, Eindhoven, The Netherlands.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Puesta a punto de la infección con *T. cruzi*

#### 6.1.1 Cultivo *in vitro* de epimastigotas

Para analizar el comportamiento y la cinética de crecimiento de parásitos epimastigotas *in vitro* en medio BHI a 28°C, se comenzó un cultivo de la cepa CL Brener y se analizó su curva crecimiento a lo largo del tiempo. Se realizaron repiques cada tres días diluyendo 1:10 los parásitos en fase exponencial de crecimiento hasta una concentración aproximada de  $2 \times 10^6$  parásitos/mL, para conservar el cultivo fresco y mantener los parásitos en buen estado metabólico. Se siguió el crecimiento de los parásitos a través de una curva de crecimiento, la misma se comenzó a partir del cuarto repique comenzando con una concentración de  $2 \times 10^6$  parásitos/mL y se realizó por conteo directo de parásitos de forma directa en cámara de Neubauer (Figura 4).



**Figura 4.** Curva de crecimiento de epimastigotas de la cepa CL Brener crecidos en medio BHI suplementado con 10% de SFB a 28°C. Se muestra el promedio del conteo de tres cultivos independientes de parásitos en cada punto de la curva analizado con el desvío estándar correspondiente.

### 6.1.2 Obtención de una Infección primaria a partir de epimastigotas estresados nutricionalmente

Como paso inicial para obtener tripomastigotas celulares, se estableció una infección primaria usando epimastigotas bajo estrés nutricional de más de 18 días de cultivo. Estos parásitos son capaces de infectar células en monocapa con una menor eficiencia que los tripomastigotas celulares. El cultivo se dejó envejecer para provocar estrés nutricional a los parásitos acercándolos hacia un estado con características de un tripomastigota metacíclico, o incluso inducir su diferenciación. Esta forma parasitaria se ha reportado que es capaces de infectar células de mamíferos (Batista, 2015). Se utilizaron estos parásitos para infectar células de mamífero (VERO) en una relación 100 parásitos/célula.

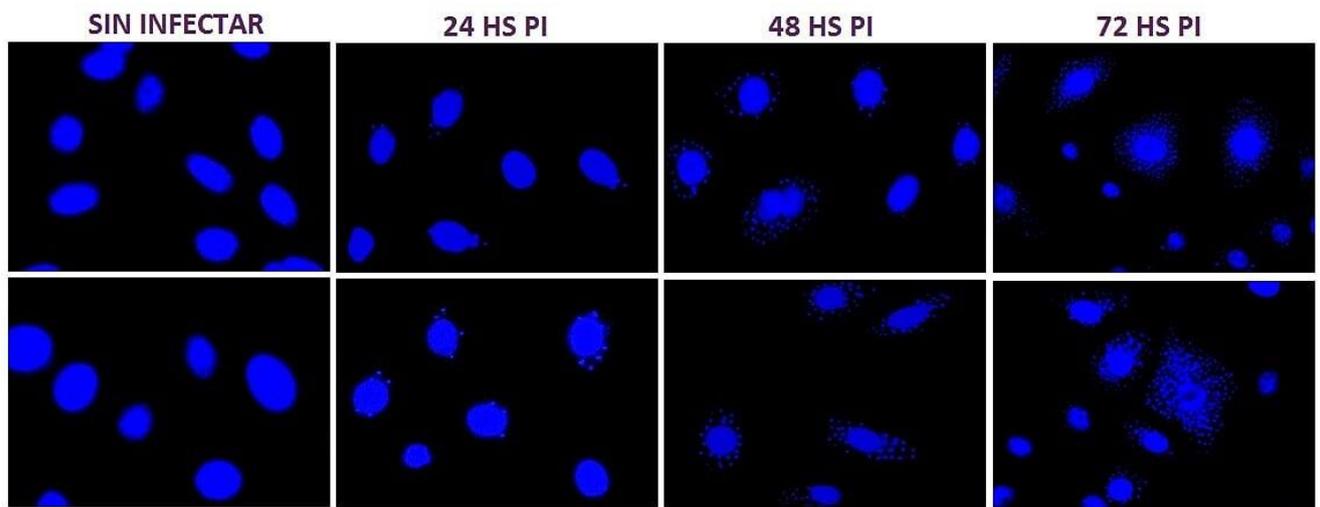
A las 24 horas de e iniciada la infección, se lavó la monocapa celular con PBS para remover los parásitos que no se internalizaron en la célula y se dejó la monocapa infectada con medio RPMI completo. La infección fue seguida día a día por microscopia óptica en *The ZOE Fluorescent Cell Imager*. Se controló el estado de las células infectadas, el aumento de amastigotas intracelulares conforme avanzaba la infección, hasta finalmente detectar la salida de los parásitos. Al cabo de aproximadamente 10-12 días luego de realizada la infección, se colectó el sobrenadante de dicho cultivo conteniendo los parásitos que salieron se la célula, llamados ahora tripomastigotas celulares. Dado que la eficiencia de infección de esta población de parásitos estresados es relativamente baja, a lo largo de la misma se observaron pocas células infectadas obteniéndose una infección asincrónica y liberándose al medio de cultivo tripomastigotas celulares a diferentes tiempos por lo que el rendimiento de tripomastigotas celulares fue relativamente bajo pero aceptable para establecer una nueva infección. Se purificaron los tripomastigotas celulares mediante centrifugación del sobrenadante a 3.000 g por 15 minutos.

### 6.1.3 Establecimiento de Infección con tripomastigotas celulares

La mayor parte de la información que concierne al proceso de amastigénesis *in vitro* e *in vivo* proviene del estudio de formas de tripomastigotas derivadas de tejido también llamados tripomastigotas celulares (Contreras, et al., 2002).

En este trabajo, se utilizaron estos tripomastigotas celulares para infectar nuevamente células VERO semiconfluentes crecidas en monocapa en una razón de 10 parásitos/célula, y así establecer esta vez una segunda infección. La infección fue seguida y controlada de la misma forma. En este caso tripomastigotas celulares derivados de esta última infección fueron recuperados del sobrenadante luego de aproximadamente 4-5 días. La menor duración en salir los tripomastigotas celulares al medio podría explicarse por la mayor eficiencia de estos parásitos de infectar células de mamífero. Este resultado contrasta con el de la infección con epimastigotas estresados, donde se demoró varios días para percibir células infectadas, en este caso de infección con tripomastigotas celulares, se observan bastantes células infectadas a las 24 horas post infección (Figura 5).

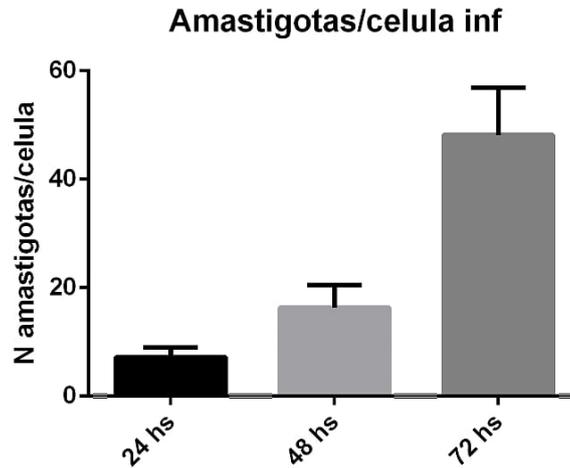
Con el fin de caracterizar la infección establecida de *Trypanosoma cruzi*, la misma se generó en placas de 24 pocillos para su posterior análisis. Se sembraron 50.000 células VERO por pocillo y se las infectó con *T. cruzi* en una razón de 10 parásitos/célula. Se tuvo además un control de células VERO sin infectar. A las 24 hs post infección se lavan todos los pocillos con PBS (incluido el control) y se coloca 600 µL de medio RPMI completo fresco. Luego de 24, 48 y 72 hs post-infección las células fueron lavadas 2 veces con cantidades necesarias de PBS 1X con el fin de cubrir toda la superficie y retirar células muertas y/o cualquier otro tipo de residuo que pueda interferir luego en la visualización. Posteriormente, fueron fijadas con PFA 4% y teñidas con DAPI. (Figura 5).



**Figura 5.** Microscopia de epifluorescencia de una infección en proceso de *T. cruzi*. Las células fueron fijadas con PFA 4% y teñidas con DAPI. Las fotos fueron tomadas por The ZOE Fluorescent Cell Imager. De izquierda a derecha: células VERO sin infectar; células VERO infectadas: 24, 48 y 72 hs post-infección.

Se eligieron 6 campos al azar y al menos 500 células fueron contadas para cada condición. Se determinó el porcentaje de infección como el número de células infectadas en función del total de células, así como el número de amastigotas intracelulares sobre el total de células infectadas. (Figura 6). Las fotos fueron tomadas en *The ZOE Fluorescent Cell Imager* y procesadas en *ImageJ*.

En todas las infecciones realizadas el porcentaje de infección superó el 90% a las 72 horas post infección. En cuanto al **número de amastigotas intracelulares**, se puede observar como **aumentan conforme se desarrolla la infección** al pasar las horas. En las primeras 24 hs, los amastigotas lograron replicarse llegando a un valor de no más de 10 amastigotas por célula. Este valor se duplica al alcanzar las 48 hs, donde se registran entre 10 y 20 amastigotas intracelulares. Finalmente, a las 72 hs de infección prácticamente todo el citoplasma de la célula se encuentra poblado por más de 40 parásitos por célula.



**Figura 6.** Gráfico que representa el número de amastigotas intracelulares por célula infectada. Se contó el total de amastigotas intracelulares y se dividió por el total de células infectadas en cada foto tomada por campo. Se muestra el resultado del promedio del conteo de al menos 500 células con el desvío estándar correspondiente.

## 6.2 Obtención de amastigotas axénicos y celulares

Para la generación de amastigotas axénicos se siguió el protocolo planteado por (Batista et al., 2015) con la única diferencia de que se utilizó medio RPMI para su diferenciación en lugar de medio DMEM descrito por el autor. Se tuvo la precaución de corroborar que efectivamente el pH del medio fuese el mismo (pH 5). Primeramente, se incubaron tripomastigotas derivados de una infección de células VERO, en RPMI completo a 37 °C durante 24 hs, sabiendo que en dichas condiciones los mismos se diferencian a amastigotas axénicos (Batista, 2015). Pasado el tiempo, se centrifugó a 3.000 g por 10 minutos y se incubó a 37 °C durante 2 hs, esperando de esta manera que aquellos tripomastigotas que no se hayan diferenciado, al poseer flagelo puedan “subir” al sobrenadante mientras que los amastigotas permanezcan en el pellet. Se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS 1X, luego de centrifugó nuevamente a 3.000 g por 10 minutos y se resuspendió en 1 mL de Trizol para posterior extracción de ARN. Una alícuota de los amastigotas axénicos en PBS purificados fue conservada para su visualización bajo *The ZOE Fluorescent Cell Imager* donde se observó una estructura característica, pequeña, redondeada y sin flagelo, muy diferente al del tripomastigota validándose de esta manera la eficiencia de la técnica.

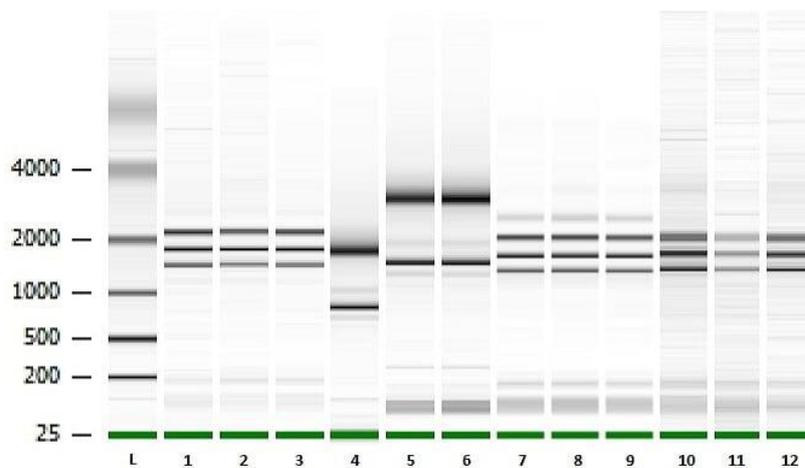
Además, repicando el cultivo obtenido cada dos generaciones (aproximadamente cada 31 hs), es posible aumentar *in vitro* el número de amastigotas axénicos de alta pureza de forma muy eficiente (Engel, et al., 1987). Nuestro método elegido para diferenciación hacia amastigotas a partir de tripomastigotas celulares difiere de otros autores como (Engel and Dvorak, 1988), en el cual la diferenciación ocurre en medio LIT y la incubación se realiza a 26 °C por 72 hs; así también como para (Engel, et al., 1987) donde la transformación espontánea ocurre en medio BHT a 28 °C.

La extracción de amastigotas intracelulares se realizó de acuerdo al siguiente protocolo (Batista, 2015), a diferencia que en nuestro caso se cambió el método empleado para la lisis celular ya que este último utiliza cavitación por descompresión con nitrógeno para la disrupción celular (Batista, 2015). En este trabajo, se usó una infección de 3 días para maximizar el número de parásitos intracelulares, así como el número de células íntegras, y se lavó 2 veces con PBS para eliminar contaminación con amastigotas extracelulares o tripomastigotas celulares que hayan emergido tempranamente. Se tripsinizó el cultivo por 10 minutos a 37 °C y a continuación se lisaron las células hospederas por rotura mecánica a través de sucesivos pasajes por jeringa de 25 gauges. Dado que los tripanosomátidos tienen una malla de microtúbulos que les confiere resistencia bajo presiones mecánicas (Batista, 2015), de esta manera nos aseguramos de romper únicamente las células hospederas y no los amastigotas contenidos en ellas, esto fue verificado por microscopía óptica. A continuación, se realizó una primera centrifugación a baja velocidad (10 minutos a 800g) de manera de obtener un pellet con restos celulares y núcleos, y un sobrenadante con el contenido citosólico de las células en el cual se encuentran los amastigotas intracelulares. Finalmente, se centrifugó el sobrenadante conteniendo los amastigotas a alta velocidad (3.000 g por 10 minutos) obteniendo así los amastigotas en el pellet, que fueron posteriormente lavados con PBS 1X para su posterior extracción de ARN o evaluación microscópica.

El producto final de la extracción también fue verificado bajo la visualización *The ZOE Fluorescent Cell Imager*. En éste se observaron únicamente formas redondeadas similares a los obtenidos para amastigotas axénicos.

### 6.3 Análisis comparativo de expresión diferencial de genes

La calidad de las muestras de ARN es fundamental en un contexto de análisis de expresión génica, por lo que previo a los análisis de cuantificación por PCR en tiempo real, con el fin de garantizar una buena calidad del ARN extraído, se analizó la misma en un Bioanalyzer para las tres réplicas biológicas realizadas en cada caso (Figura 7). La cantidad e integridad del ARN total extraído con Trizol y tratado posteriormente con ADNs para dichas muestras fue analizada en un Agilent 2100 Bioanalyzer, empleándose un Agilent RNA 6000 Nano Chip (Agilent). Como se aprecia en la Figura 7 el ARN se encuentra íntegro ya que para todas las muestras se puede observar claramente las 3 bandas correspondiente a los ARN ribosomales a la altura aproximada de 2000 pb. Se puede observar que en los carriles 4, 5 y 6 correspondiente a los amastigotas celulares, hubo un desfase en la corrida, pero igualmente presentan el mismo perfil que el resto de las muestras.

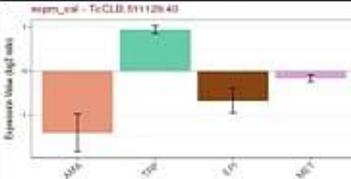
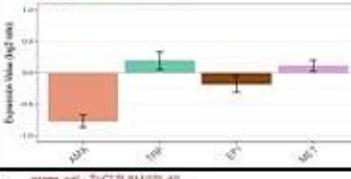
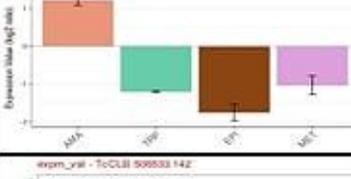
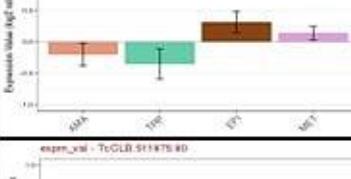
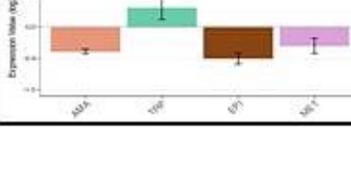


**Figura 7.** Control de calidad de las muestras de ARN total extraídas, en un Agilent RNA 6000 Nano Chip, en un Agilent 2100 Bioanalyzer. Amastigotas axénicos (1-3); amastigotas celulares (4-6); epimastigotas del día 7 (7-9); tripomastigotas celulares (10-12). Para todas las muestras se observan las tres bandas correspondientes a los ARN ribosomales a la altura de 2000 pb.

Una vez verificada la buena calidad del ARN obtenido, se procedió a generar el ADNc para usar como molde en PCR cuantitativo para cuantificar y analizar la expresión de algunas proteínas de superficie características de diferentes estadios. Muchas de estas

proteínas están implicadas en factores de virulencia, así como también relacionados a la invasión celular y evasión de la respuesta inmune del hospedero.

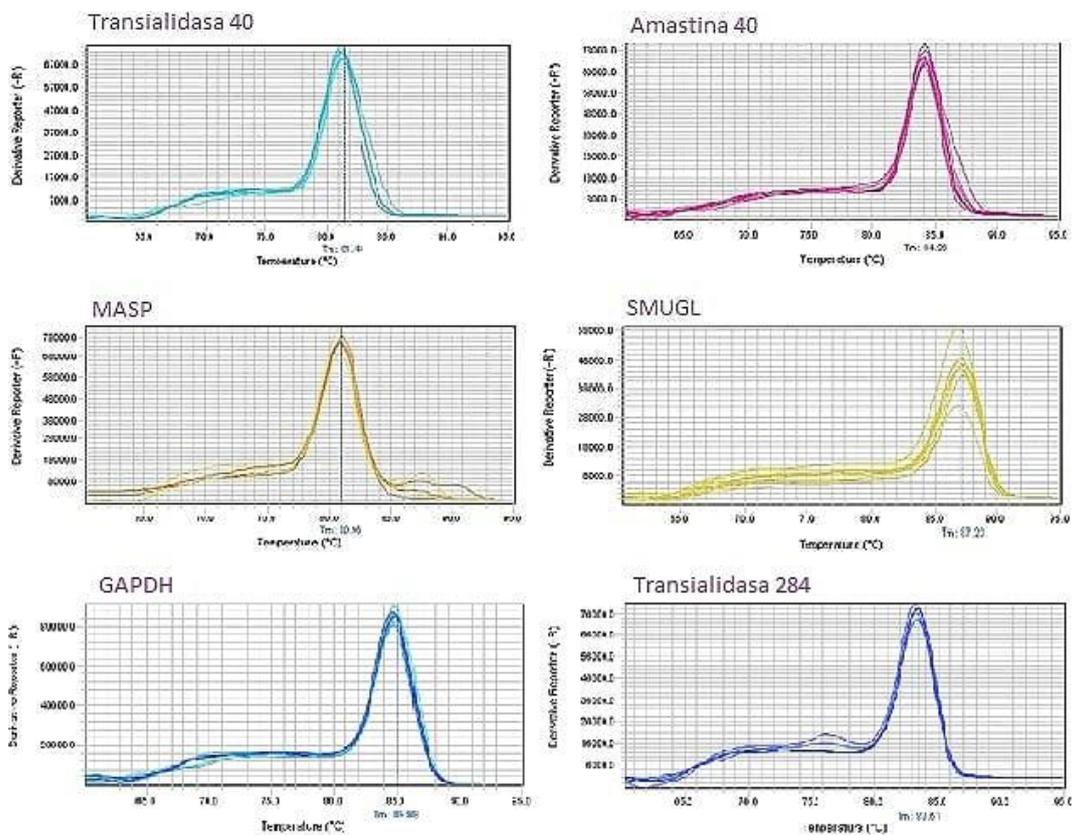
Se diseñaron cebadores específicos para cada gen con la herramienta online *OligoPerfect Primer Designer* disponible en <https://www.thermofisher.com>, (Tabla 1). La cuantificación de transcritos de interés se realizó relativa a la cantidad de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen de expresión constitutiva.

	Familia	Grupo	Proteína	Expresión
	Transialidasa	TSIII	TcCLB.511129.40	
Secuencia de ARN	CCGCCATCGTGTGGATCATTACGACGTGAAAATTGAC CGCCTGTTGAGCCCACTGCCATTGTGGATGAAAGGG ATAGTGAAACAAATGCTCTTGTGCGGG			
Cebadores	CCGCCATCGTGTGGATCATT		FWD	
	CCCCGACAAGAGCATTTGTTTC		REV	
	Transialidasa	TSIV	TcCLB.510307.284	
Secuencia de ARN	TTTGTACGAGGCCAGTGTGGAAAGCGACTCCGTCCCT ACCCCTTGATCTGACGCTTGAAGTGCAGAGGATAAG GCATGCGCTGTC			
Cebadores	TTTGTACGAGGCCAGTGTGG		FWD	
	GACAGCGCATGCCTTATCCTCT		REV	
	Amastina	amastina 40	TcCLB.511071.40	
Secuencia de ARN	CTTCTCCATCGTTTCCATTGCCCTGCTGCTTGTGCCAC CATCCTTGGCGTGTGTACACCTCTACAAAAGTCTCT CAGGACCTTGACGAATGTGCTGTTGGTGTCTGGCAT			
Cebadores	CTTCTCCATCGTTTCCATTGC		FWD	
	ATGCCAGACCAACAGCACAT		REV	
	Mucina	TcSMUGL	TcCLB.506533.142	
Secuencia de ARN	GTGCTTTTGTGGCCCTCTGCTGTGCGTGCGTGTGCGC CACGGCCAGGAGGAGGGGAGTACGATGCTGCTGT TTTGAAGGC			
Cebadores	GTGCTTTTGTGGCCCTCTGCT		FWD	
	GCCTTCAAACAGCAGCATCGT		REV	
	Masp	MASP	TcCLB.511875.80	
Secuencia de ARN	GGCATTGAGCCAACAACAGATGCAAGGCAGAATGCAA TAACTGAGGGTCAGGCAGAAACAACCTCACCATCTTCT TCTGCGG			
Cebadores	GGCATTGAGCCAACAACAGATG		FWD	
	CCGCAGAAGAAGATGGTGAGG		REV	

**Tabla 1.** Cebadores empleados para verificar genes diferencialmente expresados en *T. cruzi*. **FWD:** forward, **REV:** reverse. Se muestra además la secuencia codificante en el ARN, el ID de la proteína y el patrón de expresión disponible en el *Tritypdb*. En rosa se representa el nivel de expresión en los amastigotas, en verde en los tripomastigotas celulares, en marrón en los epimastigotas y en violeta en los tripomastigotas metacíclicos.

Si bien los oligonucleótidos cebadores fueron dirigidos a regiones únicas de cada transcripto, dado que se trata de familias multigénicas y que además hay errores en la anotación de las mismas en las bases de datos, para verificar la presencia de efectivamente un único producto de amplificación por reacción, se analizaron las curvas de *melting* correspondientes a cada reacción (Figura 8). Se puede observar que para todos los genes ensayados se obtuvo un único pico por reacción lo que se traduce en un único producto de amplificación.

Antes de realizar la cuantificación relativa propiamente dicha, se determinó la eficiencia de amplificación para cada uno de los cebadores empleados a partir de la pendiente del gráfico de los valores de amplificación  $C_T$  en función del logaritmo del valor de concentración del ADNc molde de las muestras obtenidas por diluciones seriadas (Figura 9).

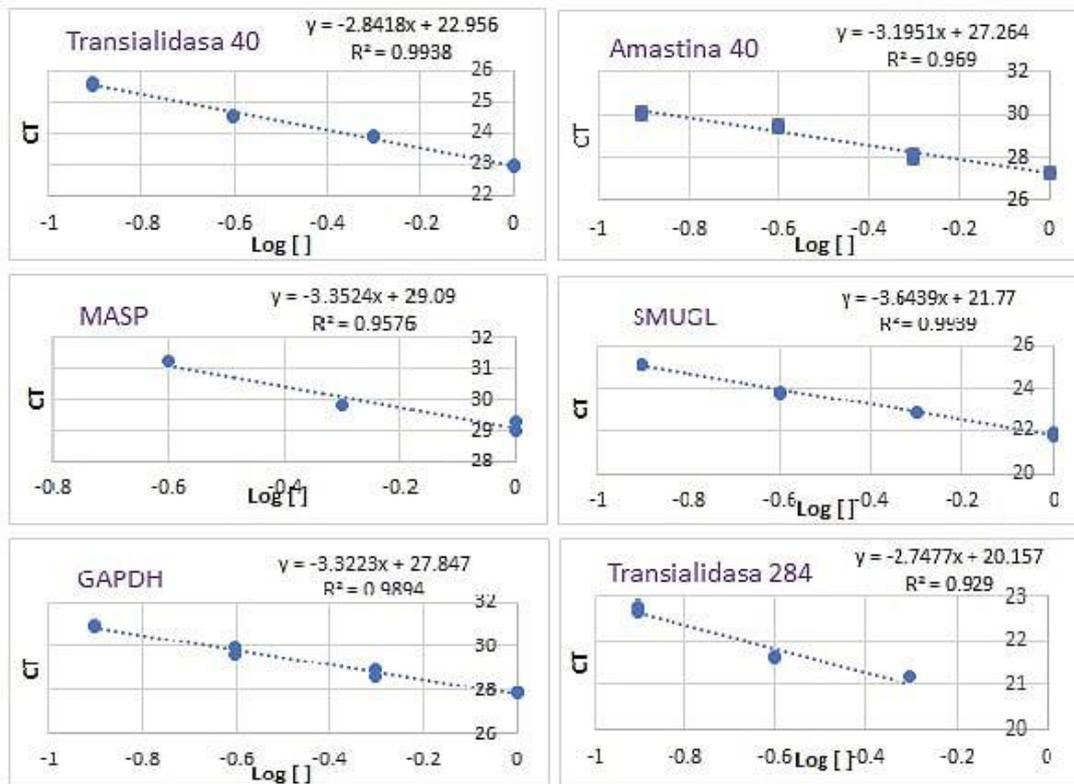


**Figura 8.** Curvas de *melting* para los genes estudiados mostrando la presencia de un solo producto de amplificación en diferentes reacciones con diferentes ADNc molde.

Para todos los genes analizados, se obtuvieron eficiencias similares (superiores al 90%). Esos genes elegidos fueron los que se utilizaron para el posterior análisis comparativo de las proteínas de superficie (Tabla 2).

Gen	% Eficiencia
Transialidasa 40	104%
Transialidasa 284	103%
Amastina 40	106%
MASP	99%
SMUGL	90%
GAPDH	100%

**Tabla 2.** Eficiencias calculadas a partir de la pendiente del gráfico  $C_T$  vs log de la concentración según:  $Eficiencia = [10^{-(1/pendiente)}]-1$ .



**Figura 9.** Curvas de eficiencia para los genes ensayados.

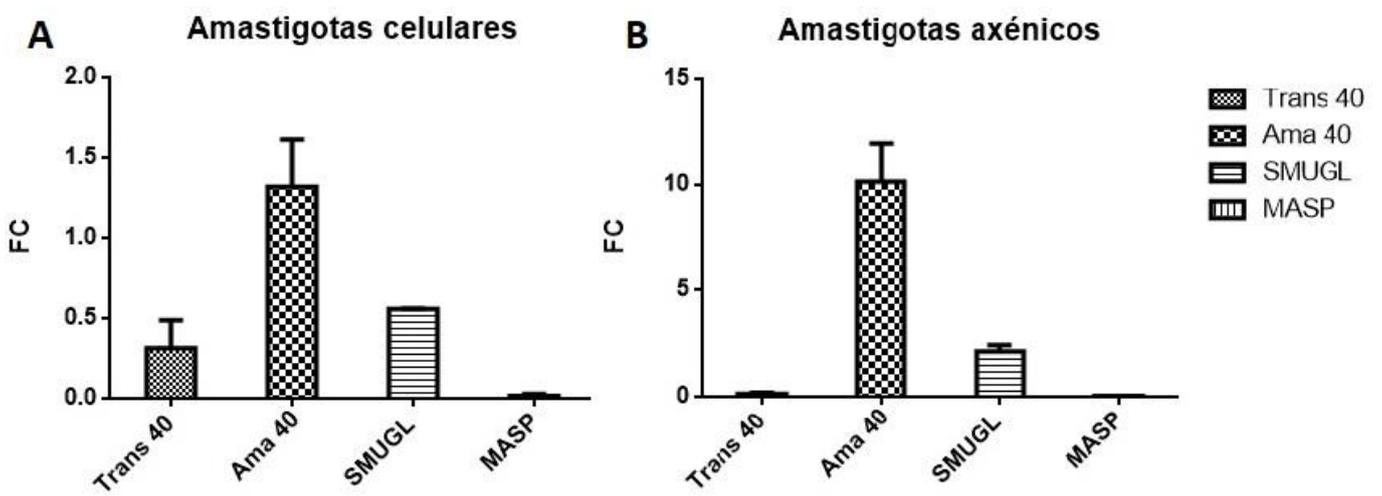
Dentro del grupo de genes elegidos, de acuerdo a los valores relativos de ARN calculados, se puede decir que para los amastigotas intracelulares, la proteína de superficie más expresada es la amastina 40 (Figura 10.A). Coincidiendo de esta manera

con la bibliografía dónde dentro de la familia Amastina, el grupo de proteínas  $\delta$ -amastina 40 se encuentra regulado positivamente para el estadio amastigota (Pech-Canul, et al., 2017). Con el fin de establecer una comparación primaria con los amastigotas axénicos, para estos últimos la misma proteína de superficie también que se encuentra diferencialmente expresada y aumentada con respecto al resto de los genes estudiados (Figura 10.B). Teniendo en cuenta que la  $\delta$ -amastina en cuestión se usa como **marcador de amastigotas**, podríamos decir que los **amastigotas axénicos constituirían un buen modelo de estudio a juzgar por la alta expresión de dicho marcador**. Vale aclarar que mientras que para los amastigotas intracelulares la expresión está aumentada aproximadamente 1.5 veces con respecto al control GAPDH, en los amastigotas axénicos este aumento es sustancialmente mayor (10 veces más). Para el caso de epimastigotas y tripomastigotas (Figura 11.A y 11.B respectivamente), no se observa un aumento en la expresión de amastina, indicando que los amastigotas axénicos compartirían más similitudes con los amastigotas celulares que con estos otros estadíos.

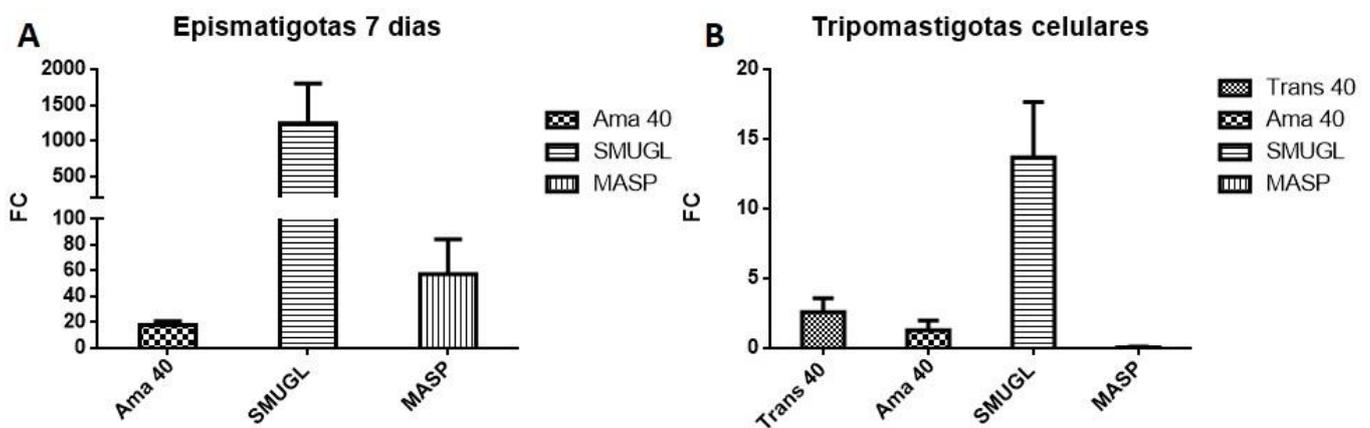
Los niveles de expresión de la transalidasa del grupo III (trans40), cuya expresión está reportada como aumentada en tripomastigotas (Tabla 1), son similares en amastigotas axénicos y en amastigotas celulares reflejando nuevamente una similitud en la expresión de este otro marcador. Como control positivo, se vio que este mismo marcador aparece aumentado más de 2,5 veces en tripomastigotas con respecto a GAPDH.

Con respecto a la proteína de superficie TsSMUG, también se encontró cierta coincidencia en los niveles de expresión entre amastigotas axénicos y celulares, donde la expresión relativa a GAPDH aumenta entre 2 y 0,7 veces respectivamente, mientras que en epimastigotas (Figura 11.A), el estadio donde está reportada su máxima expresión (Tabla 1) aumenta entre 100-1500 veces con respecto al gen control. También se ve un aumento considerable en la expresión relativa a GAPDH de dicho ARNm para tripomastigotas celulares (~15 veces) (Figura 11.B). Este resultado sugiere **nuevamente que los amastigotas celulares y axénicos se parecen más entre sí que con los epimastigotas y con los tripomastigotas celulares en términos de expresión de este otro marcador de superficie**.

Con respecto a la expresión de uno de los ARNm de la familia de las MASP, reportada de alta expresión en tripomastigotas celulares (Tabla 1), los resultados son controversiales, pues su expresión en tripomastigotas celulares (Figura 11.B) no se ve aumentada con respecto a GAPDH apareciendo sí aumentada unas 50 veces en epimastigotas (Figura 11.A) con respecto al gen control. De todas formas, el nivel de expresión de este ARNm para la proteína MASP es similar en amastigotas celulares al nivel de expresión en amastigotas axénicos (Fig 10.A y 10.B respectivamente).



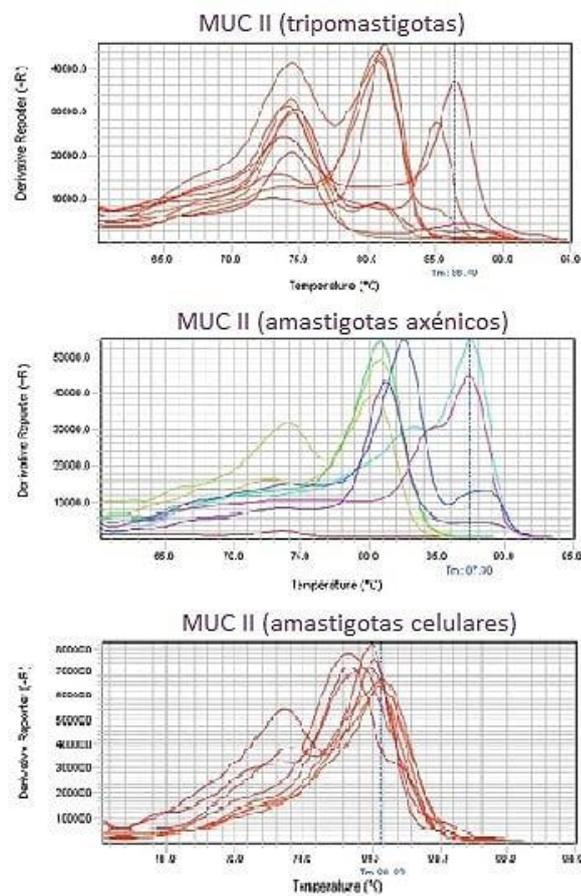
**Figura 10.** Expresión relativa a *gapdh* de los ARNm codificando para diferentes proteínas de superficie usadas como marcadores de los diferentes estadios. Se muestran los resultados para amastigotas celulares (A), y amastigotas axénicos (B). Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes, cada uno realizado en triplicados técnicos con su correspondiente desvío estándar.



**Figura 11.** Expresión relativa a *gapdh* de los ARNm codificando para diferentes proteínas de superficie usadas como marcadores de los diferentes estadios. Se muestran los resultados para epimastigotas (A), y tripomastigotas celulares (B). Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes, cada uno realizado en triplicados técnicos con su correspondiente desvío estándar.

Vale destacar que se analizó también la expresión de otros genes de interés dentro del grupo de las mucinas, como MUC II u otras TcS caracterizadas como GP63, pero o bien las eficiencias no resultaron buenas, o las curvas de *melting* acusaban la presencia de más de un producto de amplificación inespecífico (Figura 12).

Se intentó obtener un perfil con producto único de amplificación para las MUC II variando temperatura de hibridación de los cebadores y cambiando la concentración de los cebadores, pero no fue posible. Probablemente, la razón pueda deberse a que se trata de una amplia familia multigénica de proteínas polimórficas, y al tener secuencias similares entre los miembros del grupo sea más difícil dirigir la expresión hacia un único producto. Por otro lado, es sabido que hay errores en la anotación de genes en las bases de datos, principalmente en lo que refiere a familias multigénicas. En estos casos se hace difícil el diseño de los cebadores de manera de dirigir exclusivamente la amplificación hacia una única proteína.



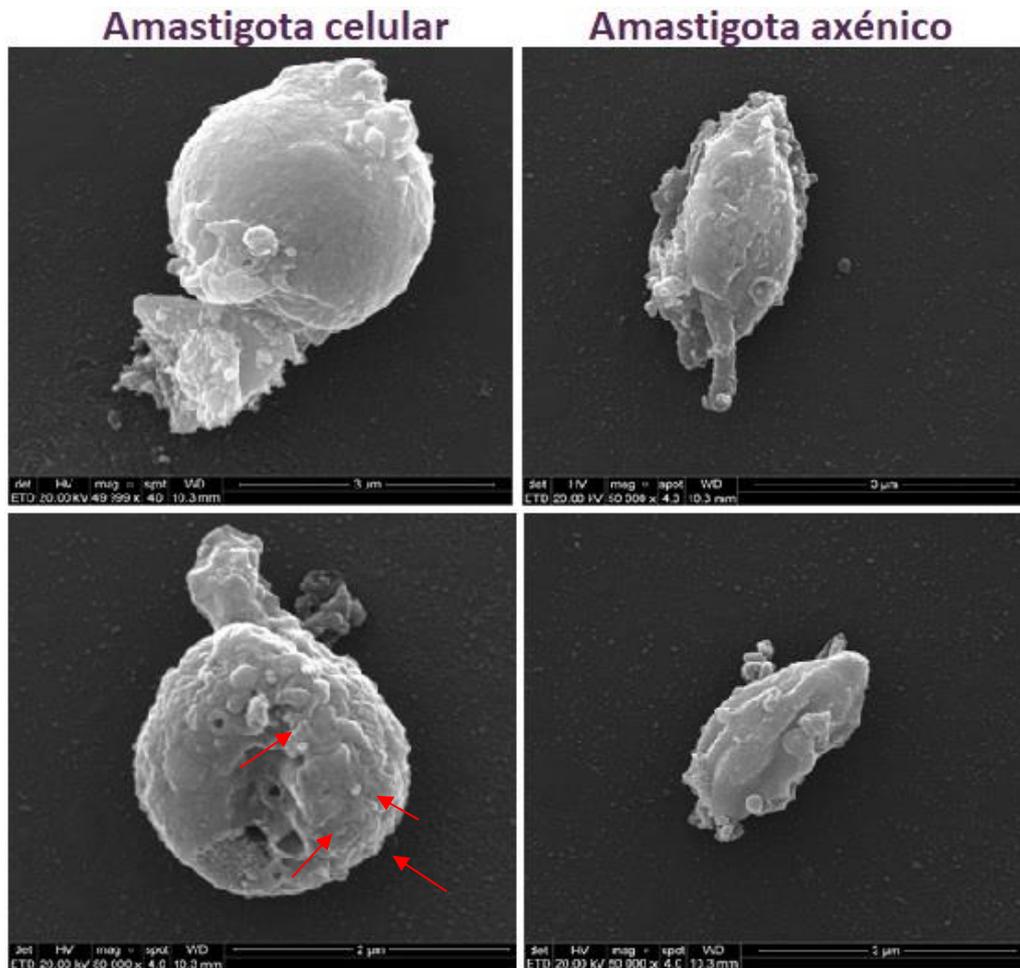
**Figura 12.** Curvas de melting para las MUC II (subgrupo de la superfamilia mucinas)

En suma, el análisis de los niveles expresión de los ARNm para las proteínas de superficie seleccionadas revelan una similitud en la expresión de las mismas para amastigotas celulares y axénicos, por lo que éstos últimos constituirían un modelo prometedor de estudio.

#### 6.4 Análisis morfológico de los distintos estadios

Con el fin de comparar la morfología de los amastigotas axénicos purificados respecto a los amastigotas celulares, éstas fueron analizadas por *Microscopia Electrónica de Barrido* (MEB) (Figuras 13).

En los amastigotas celulares se observa una morfología más redondeada que en los amastigotas axénicos que se presentan con una morfología más ovalada y un tamaño menor (Figura 13). Por otro lado, en ambos se observa un flagelo corto. Por otro lado, en los amastigotas celulares se observan pequeños poros (flecha roja en Figura 13), para los cuales podría especularse una función de intercambio molecular con la célula hospedera.



**Figura 13.** Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) para amastigotas celulares y amastigotas axénicos. Con flechas rojas se señalan los poros.

Las similitudes morfológicas, así como la similitud en la expresión de las proteínas de superficie analizadas sugieren que los amastigotas axénicos podrían constituir un buen modelo de estudio del estadio intracelular. Para complementar este trabajo, nos proponemos en un futuro analizar los **patrones de expresión global** de ambos modelos, comparando el transcriptoma obtenido por secuenciación masiva.

## 7. Conclusiones y perspectivas

### 7.1 Conclusiones

En este trabajo se consiguió poner a punto y establecer una infección *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* en células de mamífero. Se logró obtener un porcentaje de infección por encima del 90% conteniendo más de a 40 amastigotas intracelulares por célula luego de 72 hs post infección.

Se generó una infección sincrónica y controlada a partir de tripomastigotas celulares, y se estableció una duración de 4 días entre la infección inicial y la salida de tripomastigotas.

Se obtuvieron amastigotas axénicos purificados a partir de tripomastigotas celulares.

Se obtuvieron amastigotas intracelulares a partir una infección con tripomastigotas celulares de *T. cruzi*.

Se encontraron similitudes en la expresión de proteínas de superficie estadio específicas seleccionadas para su análisis.

Mediante Microscopia Electrónica de Barrido se determinó que los amastigotas axénicos son apenas menores que los amastigotas celulares y un poco más ovalados.

Los datos presentados en este trabajo contribuyen a la caracterización del único estadio intracelular del parásito y pone de **manifiesto la utilidad del uso de amastigotas axénicos como modelo de estudio de amastigotas celulares.**

### 7.2 Perspectivas

Ampliar el repertorio de análisis de proteínas de superficie incluyendo otros genes marcadores en los ensayos de expresión génica diferencial por qPCR.

Para complementar los datos, se pretende realizar un análisis transcriptómico por secuenciación masiva de las distintas muestras. De esta manera poder definir cuáles son los genes y/o vías que estarían directamente influenciadas por el medio intracelular en la interacción con el hospedero, contribuyendo así el disparo de los mecanismos para la transición hacia el estadio amastigota.

## 8. Referencias bibliográficas

Batista, C.M.K., R. L.; Eger, I.; Soares, M. J. (2015) *Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes, *PLoS one*, **10**, e0130165.

Berna, L., *et al.* (2017) Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*, *PeerJ*, **5**, e3017.

Burleigh, B.A. and Andrews, N.W. (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells, *Annu Rev Microbiol*, **49**, 175-200.

Buscaglia, C.A., *et al.* (2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity, *Nature reviews. Microbiology*, **4**, 229-236.

Buscaglia, C.A., Di Noia, J. M. (2003) *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease, *Microbes and infection / Institut Pasteur*, **5**, 419-427.

Caradonna, K.L. and Burleigh, B.A. (2011) Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*, *Advances in parasitology*, **76**, 33-61.

Cerecetto, H., González, M. (2012) Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. <http://cedicpy.files.wordpress.com/2012/03/libro20chagas.pdf>.

Contreras, V.T., *et al.* (2002) Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 1213-1220.

Cruz, M.C., *et al.* (2012) *Trypanosoma cruzi*: role of delta-amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation, *PLoS one*, **7**, e51804.

Daniels, J.P., Gull, K. and Wickstead, B. (2010) Cell biology of the trypanosome genome, *Microbiol Mol Biol Rev*, **74**, 552-569.

De Carvalho, T.U., De Souza, W. (1986) Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **28**, 205-212.

De Pablos, L.M. and Osuna, A. (2012) Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity, *Infection and immunity*, **80**, 2258-2264.

de Souza, W., de Carvalho, T.M. and Barrias, E.S. (2010) Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction, *International journal of cell biology*, **2010**.

El-Sayed, N.M., *et al.* (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease, *Science*, **309**, 409-415.

Elias, M.C., *et al.* (2001) Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation, *Molecular and biochemical parasitology*, **112**, 79-90.

Engel, J.C. and Dvorak, J.A. (1988) *Trypanosoma cruzi*: cell biological behavior of epimastigote and amastigote forms in axenic culture, *The Journal of protozoology*, **35**, 513-518.

Engel, J.C., *et al.* (1987) Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes, *Molecular and biochemical parasitology*, **26**, 1-10.

Franchin, G., *et al.* (1997) Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice, *Infection and immunity*, **65**, 2548-2554.

Frasch, A.C. (2000) Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*, *Parasitology today*, **16**, 282-286.

Freitas, L.M., *et al.* (2011) Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity, *PloS one*, **6**, e25914.

Garzoni, L.R., *et al.* (2003) Characterization of  $[Ca^{2+}]_i$  responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 487-493.

Giorgi, M.E. and de Lederkremer, R.M. (2011) Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite, *Carbohydrate research*, **346**, 1389-1393.

Hernandez-Osorio, L.A., *et al.* (2010) Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms, *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2010**, 283842.

Hoffmann, A.J., M.; Ochsenreiter, T. (2016) A novel component of the mitochondrial genome segregation machinery in trypanosomes, *Microbial cell*, **3**, 352-354.

Kramer, S. (2012) Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids, *Molecular and biochemical parasitology*, **181**, 61-72.

Magdesian, M.H., *et al.* (2001) Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor, *The Journal of biological chemistry*, **276**, 19382-19389.

Malik, L.H., Singh, G.D. and Amsterdam, E.A. (2015) Chagas Heart Disease: An Update, *The American journal of medicine*, **128**, 1251 e1257-1259.

Martinez-Calvillo, S., *et al.* (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites, *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2010**, 525241.

Moloney, A. (2009) Trial renews interest in Chagas' disease, *Lancet*, **374**, 1490.

Morita, Y.S., *et al.* (2000) Glycosyl phosphatidylinositol myristoylation in African trypanosomes. New intermediates in the pathway for fatty acid remodeling, *The Journal of biological chemistry*, **275**, 14147-14154.

Navarro, M.C., *et al.* (2003) Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **98**, 83-91.

Nunes, M.C., *et al.* (2013) Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects, *Journal of the American College of Cardiology*, **62**, 767-776.

Nunes, M.P., *et al.* (2013) Inhibitory effects of *Trypanosoma cruzi* sialoglycoproteins on CD4+ T cells are associated with increased susceptibility to infection, *PloS one*, **8**, e77568.

OPS (2004) *Organización Panamericana de la Salud*. XIIIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=15350&Itemid=270&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=15350&Itemid=270&lang=es).

PAHO (2018) Pan American Health Organization. Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es).

Pech-Canul, A.C., Monteon, V. and Solis-Oviedo, R.L. (2017) A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*, *Journal of parasitology research*, **2017**, 3751403.

Rassi Jr, A., Rassi, A., Marin-Neto J.A. (2010) Chagas disease, *Lancet*, **375**, 1388-1402.

Rochette, A., *et al.* (2005) Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp, *Molecular and biochemical parasitology*, **140**, 205-220.

Schenkman, S., Pascoalino Bdos, S. and Nardelli, S.C. (2011) Nuclear structure of *Trypanosoma cruzi*, *Advances in parasitology*, **75**, 251-283.

Schofield, C.J., Galvao, C. (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae, *Acta tropica*, **110**, 88-100.

Shapiro, T.A. and Englund, P.T. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA, *Annu Rev Microbiol*, **49**, 117-143.

Souza, W. (2009) Structural organization of *Trypanosoma cruzi*, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104 Suppl 1**, 89-100.

Tomlinson, S. and Raper, J. (1998) Natural human immunity to trypanosomes, *Parasitology today*, **14**, 354-359.

WHO (2002) Control of Chagas disease, *World Health Organ Tech Rep Ser*, **905**, i-vi, 1-109, back cover.

WHO (2018) World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/chagas/disease/en/>.

Woolsey, A.M. and Burleigh, B.A. (2004) Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments, *Cellular microbiology*, **6**, 829-838.

Yoshida, N. (2008) *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity, *Parasitol Int*, **57**, 105-109.

Zingales, B., *et al.* (1997) Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**, 811-814.