

A scanning electron micrograph (SEM) showing a large, complex mammalian cell with numerous fine, branching processes. A prominent, pear-shaped *Trypanosoma cruzi* parasite is attached to the cell's surface, with its flagellum extending into the cell's processes. Other smaller, rounded structures are visible in the background.

Tesis de Doctorado-PEDECIBA

Mag. María Laura Chiribao

**Estudio de la interacción
entre *Trypanosoma cruzi* y
células de mamífero**

Orientador: Dr. Carlos Robello

Co orientadora: Dra. Adriana Parodi

21/12/2016

Esta tesis de Doctorado PEDECIBA Biología fue realizada en la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo bajo la orientación del Dr. Carlos Robello y la co-orientación de la Dra. Adriana Parodi

Parte de los resultados de este trabajo fueron publicados en el artículo “*Early Trypanosoma cruzi infection reprograms human epithelial cells*” Chiribao ML, Libisch G, Parodi-Talice A, Robello C en la revista Biomedical Research International (2014)

Otra parte de los resultados se encuentran en revisión en la revista PeerJ con el artículo titulado “*Transcriptomic analysis reveals that metabolic switch and Surface remodelling are key processes for stage transition in Trypanosoma cruzi*” María Laura Chiribao, Luisa Berná, Gonzalo Greif, Matías Rodríguez, Fernando Alvarez-Valin, Carlos Robello (2016)

A. AGRADECIMIENTOS

A Malón y a Adri por su paciencia, dedicación y confianza.

A Noel, Beatriz y Eduardo por tomarse el trabajo de corregir la tesis y por todos los aportes que me realizaron.

A todos mis compañeros de Biología Molecular, que hacen que ir a trabajar sea un placer.

Agradezco especialmente a Flor, Lu y Gabi que me han ayudado directamente en distintos aspectos de mi tesis.

A todos mis compañeros del Institut Pasteur.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y a todos mis compañeros por hacerme sentir parte del grupo.

Al Departamento de Inmunobiología de la Facultad de Medicina, donde me han hecho sentir muy bienvenida. En particular a Teresa, que siempre tiene tiempo para discutir, apoyarme y trabajar.

Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, UFRJ, Brasil donde realice dos pasantías y siempre me recibieron muy bien.

Al lab de Genómica funcional- IP Maria Rosa, y Alfonso, por los experimentos iniciales con vesículas.

A la UByPA- Carlos Batthyány

Michael Parkhouse y Helena Costa, Instituto Gulbenkian, Portugal

A Fernando Hernandez, IVIC Venezuela. Gran amigo con el que realizamos experimentos de infección y microarreglos juntos.

A mis amigos, que siempre me apoyan y me quieren

A toda mi familia, en especial a mis padres

En especial a Botti, por ser tan buen compañero de trabajo y de vida. Por toda su ayuda a nivel científico, por su tiempo y por su apoyo.

A la Facultad de Ciencias, a la Facultad de Medicina, a PEDECIBA, a CSIC, a la ANII y al Instituto Pasteur, por la formación académica y el apoyo económico.

B. CONTENIDO

A. AGRADECIMIENTOS	3
B. CONTENIDO	5
D. INTRODUCCIÓN	9
1. Enfermedad de Chagas	9
2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
Generalidades	11
Ciclo de vida	11
Regulación de la expresión génica en <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Inmunidad contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
3. Interacción parásito-hospedador	17
Moléculas de superficie del parásito	18
Factores secretados en la comunicación intercelular	20
Moléculas del hospedero involucradas en la invasión	25
Internalización del parásito	26
Respuesta transcripcional de células mamíferas infectadas con <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
E. OBJETIVO GENERAL	30
F. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
G. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Cultivos celulares	31

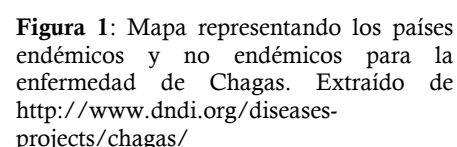
Parásitos	31
Células de mamífero	31
2. Purificación y proteómica de vesículas extracelulares	32
Vesículas de epimastigotas	32
Vesículas de tripomastigotas	32
3. Análisis por Espectrometría de masas de las vesículas extracelulares	32
4. Microscopia electrónica	33
De transmisión	33
De barrido	33
5. Transfección de líneas celulares	34
6. Medida de Luciferasa y de β galactosidasa	34
7. Ensayos de infección	34
8. Extracción de proteínas	35
9. Electroforesis en gel de poliacrilamida y Western blot	35
10. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	36
Remoción de endotoxinas	37
Conjugación al fluoróforo	37
11. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	37
12. Citometría de flujo	38
13. Cuantificación de LDL y receptor de LDL por microscopía	38
14. Ensayos de proliferación de células epiteliales	39
15. ELISA	39

ELISA Sandwich.....	39
ELISA Directo	40
Obtención de sueros humanos de pacientes chagásicos	40
16. Extracción de ARN	40
17. Síntesis del ADN copia y PCR en tiempo real.....	41
18. Microarreglos de ADN	42
19. Construcción de librerías, secuenciado y análisis de resultados de RNAseq de células humanas	43
20. Construcción de librerías, secuenciado y análisis de resultados de RNAseq de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
21. Ensayos <i>in vivo</i>	44
22. Análisis estadísticos	45
H. RESULTADOS	46
1. Respuesta celular temprana a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Análisis de vías y ontología génica	48
Respuesta inflamatoria e inducción de factores quimiotácticos durante la infección	50
Expresión de genes de respuesta al daño en el ADN en células infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
Relación entre la secreción de IL8 y la activación de la vía de respuesta al daño en el ADN	59
Alteración de genes relacionados al metabolismo lipídico en células infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
2. Análisis transcriptómico de los cambios metabólicos y de superficie asociados al ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
Cambios metabólicos durante el ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
3. Interacción de la triparredoxina peroxidasa citosólica con el hospedero mamífero.....	72
Secreción de Triparredoxina peroxidasa citosólica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	72

Interacción de cTXNPx con células de mamífero	78
Efecto de cTXNPx sobre las células epiteliales	87
Efecto de cTXNPx en macrófagos	97
Estudio de la respuesta de ratones a cTXNPx administrada intraperitonealmente	100
I. DISCUSIÓN.....	105
J. CONCLUSIONES	126
K. ANEXOS.....	127
1. Anexo 1.....	127
Genes sobreexpresados blancos de NF- κ B en células epiteliales infectadas.....	127
2. Anexo 2 Publicaciones	128
L. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

Latinoamérica ha hecho un esfuerzo importante en el control de la enfermedad. La prevalencia global estimada de infección por *T. cruzi* disminuyó desde 18 millones en 1991 a 5,7 millones en 2010 y la transmisión vectorial fue interrumpida en varios países de América del Sur y América Central entre ellos Uruguay. A través del control vectorial y pruebas inmunológicas en bancos de sangre se ha logrado reducir la incidencia de nuevos casos así como el número de muertes por esta enfermedad [10]. A pesar de ello, debido al flujo de emigrantes desde regiones endémicas hacia distintas áreas no endémicas como Estados Unidos, Canadá y muchos países de Europa, la enfermedad de Chagas se ha convertido en un problema de Salud en estos países [11] (Figura 1).



Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas son muy heterogéneas y varían dependiendo de factores relacionados con el parásito, con el hospedero y con la interacción hospedero-parásito. El transcurso de la enfermedad se puede dividir en una fase aguda y una crónica. La fase aguda está caracterizada por presentar parasitemia elevada, puede durar entre 4 y 8 semanas y es usualmente asintomática o puede presentar algunos síntomas generales como fiebre, dolor muscular, taquicardia entre otros. Sin tratamiento, cerca del 5-10% de los pacientes sintomáticos pueden morir en esta fase, la mayoría niños [12], sin embargo, el tratamiento en esta etapa con fármacos anti parasitarios es efectivo ya que cura la enfermedad y previene el desarrollo de la fase crónica [13].

Aún en ausencia de tratamiento, cerca del 60-70% de los individuos infectados no desarrollan ninguna sintomatología, por lo que se encuentran en la fase indeterminada de la enfermedad. Por el contrario, el otro 30% desarrolla las manifestaciones de distinta gravedad típicas de la fase crónica de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas de la fase crónica de la Enfermedad de Chagas están relacionadas con alteraciones estructurales y funcionales en el corazón, esófago, colon o una combinación de ellos, dando tres formas mayores: cardíaca, digestiva o cardiodigestiva. La forma cardíaca es la más severa, afecta a 20-30% de los individuos y es potencialmente letal [14]. La reactivación de la enfermedad de Chagas también se ha demostrado en pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo en coinfecciones con HIV [13].

La patogenia es compleja y pobremente comprendida. Se piensa que involucra un componente autoinmune, la respuesta inflamatoria del hospedero, así como injurias causadas por la persistencia del parásito en el tejido [15]. Sin embargo, se ha acumulado evidencia que indica que el daño en el miocardio causado por la infección crónica con *T. cruzi* es consecuencia directa de la persistencia del parásito y de la inflamación crónica asociada y no tanto por mecanismos autoinmunes [16].

El tratamiento de la enfermedad de Chagas tiene como propósito curar la enfermedad aguda, prevenir el daño en la fase asintomática, así como limitar la morbilidad y mortalidad en los casos donde la enfermedad crónica está clínicamente manifestada. Existen actualmente dos fármacos recomendados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: el Nifurtimox y el Benznidazol. De estos, el último presenta mayor eficacia y es más seguro por lo cual es utilizado en los tratamientos de primera línea. Ambos fármacos presentan efectos secundarios adversos que incluyen dermatitis alérgica, neuropatías, leucopenia, granulocitopenia, náuseas, vómitos, anorexia, así como alteraciones en el sistema nervioso central, entre otros [8]. El tratamiento es efectivo en la fase aguda de la enfermedad ya que elimina la parasitemia, reduce la duración y magnitud de los síntomas y decrece la mortalidad. En la fase crónica por otro lado, el tratamiento ha sido motivo de debate durante muchos años, debido a su dudosa eficacia y la

severidad de los efectos secundarios asociados. Actualmente, se recomienda el tratamiento en pacientes menores a 50 años cursando la fase crónica indeterminada asintomática de la enfermedad o incluso aquellos que presentan sintomatología leve [9]. Los últimos resultados del proyecto BENEFIT (Benznidazol Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) para evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con Benznidazol en pacientes con cardiomiopatía Chagásica, mostraron que si bien hubo una reducción estadísticamente significativa en la carga parasitaria de los individuos, el deterioro cardíaco no disminuyó de manera significativa en pacientes tratados [17].

2. *TRYPANOSOMA CRUZI*

Generalidades

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado kinetoplástido, que pertenece a la familia Trypanosomatidae. Dentro de las características morfológicas del parásito encontramos la presencia de una mitocondria única y altamente ramificada que se extiende por todo el cuerpo del parásito, que presenta una estructura de ADN compactado denominada kinetoplasto. El kinetoplasto se localiza cerca del cuerpo basal (región donde emerge el flagelo) y contiene dos tipos de moléculas de ADN, los maxicírculos y minicírculos [18]. *T. cruzi* presenta cuatro estadios de vida bien diferenciados y su ciclo de vida se desarrolla en un insecto vector y en un mamífero que es el hospedero definitivo. La gran diversidad a nivel genético, biológico y bioquímico entre las distintas cepas de *T. cruzi* ha permitido su clasificación en seis distintas clases discretas de tipificación denominadas DTU (“Discrete Typing Units”). Actualmente las distintas DTU se nombran de TcI a TcVI y más recientemente se agregó a la clasificación una clase denominada TcBat presente en murciélagos [19]. Tanto TcI como TcII son líneas puras que evolucionaron independientemente, la primera tiene una distribución más amplia en Sudamérica y es la responsable de la enfermedad de Chagas en los países al norte de cuenca del Amazonas. Las DTU II, V y VI están asociadas a pacientes con la fase crónica de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur y en Bolivia [20].

Ciclo de vida

Trypanosoma cruzi es un parásito intracelular obligado, que presenta un ciclo de vida complejo caracterizado por varias formas morfológicamente diferenciables, así como dos hospederos distintos (Figura 2). Las formas principales encontradas durante el ciclo de vida son: epimastigota (forma replicativa extracelular presente en el intestino anterior del insecto vector), tripomastigota metacíclico

(forma infectiva no replicativa presente en el tubo digestivo posterior del insecto vector), tripomastigota sanguíneo (que se encuentran en la sangre de mamíferos infectados y son capaces de invadir células, pero no de replicarse), y la amastigota (forma principalmente intracelular, redondeada y replicativa). Si bien en un principio se pensó que los amastigotas no eran capaces de infectar células hospederas, ahora se sabe que tienen capacidad infectiva *in vitro* [21, 22].

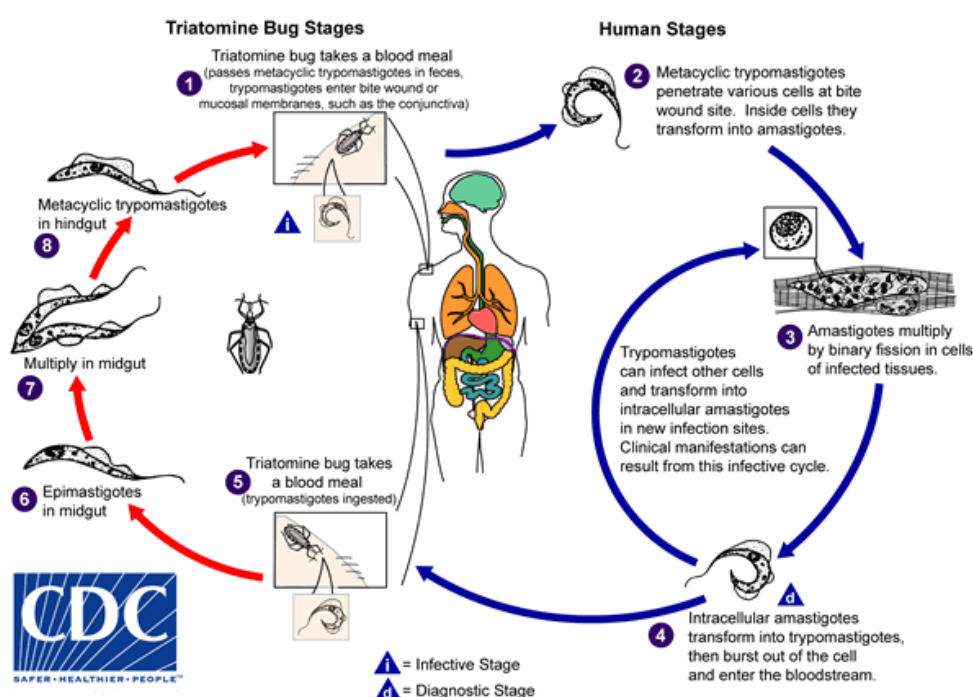


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Extraído de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, el insecto vector triatomo hematófago, se alimenta de la sangre de un mamífero infectado ingiriendo una mezcla de tripomastigotas y hasta un 10% de amastigotas. Los tripomastigotas están presentes en la sangre del hospedero definitivo, donde tienen una alta disponibilidad de glucosa, la cual usan como principal fuente de energía [23].

En el intestino medio del insecto, los tripomastigotas se transforman en epimastigotas (vía un intermediario amastigota denominado esferomastigota) y proliferan activamente. Una vez en el intestino posterior del insecto, los epimastigotas se adhieren a la pared intestinal donde se diferencian a tripomastigotas metacíclicos, proceso conocido como metaciclogénesis [24, 25]. Existen varios factores

capaces de promover la diferenciación de los epimastigotas, como la osmolaridad del entorno, la presencia de prolina y el estrés nutricional; más recientemente se demostró la contribución del estado redox del entorno tanto a la proliferación de los epimastigotas como a la metaciclologénesis [26]. Debido a la variabilidad en la disponibilidad de nutrientes en el intestino del insecto vector, se cree que los epimastigotas utilizan preferencialmente glucosa cuando hay disponibilidad [27]. Sin embargo debido a su abundancia, los epimastigotas están bien adaptados a la degradación oxidativa de aminoácidos y proteínas como principal fuente energética [27], especialmente de L-prolina [23].

Una vez diferenciados, los tripomastigotas metacíclicos son liberados con las heces del insecto vector para poder infectar a sus hospederos definitivos, mediante el contacto de las heces infectadas con heridas o mucosas del hospedero mamífero. Los tripomastigotas metacíclicos son capaces de infectar una gran variedad de células nucleadas. El mecanismo de invasión involucra el reclutamiento de lisosomas y la formación de una vacuola parasitófora de la cual el parásito escapa para convertirse en la forma amastigota en el citoplasma de la célula infectada. Debido a que los amastigotas se encuentran en el citosol celular, tienen acceso a una gran variedad de nutrientes como azúcares fosfato, intermediarios metabólicos, ácidos grasos, proteínas y aminoácidos. Ensayos realizados con amastigotas axénicos (cultivos libres de células) mostraron que tienen un metabolismo basado en la glucólisis [23], sin embargo no se conoce exactamente el metabolismo energético de las formas intracelulares. Los amastigotas se dividen por fisión binaria y cuando alcanzan una alta densidad se transforman en tripomastigotas sanguíneos los cuales lisan la célula y se liberan al torrente sanguíneo o linfa infectando nuevas células por un mecanismo similar a los metacíclicos. Las células lisadas prematuramente liberan amastigotas los cuales también pueden invadir otras células diseminando la infección [28] o ser ingeridas por un insecto vector hematófago, cerrando el ciclo.

Regulación de la expresión génica en *Trypanosoma cruzi*

Los parásitos kinetoplástidos presentan algunas características particulares en relación a la regulación de la expresión génica. Durante el ciclo de vida, *T. cruzi* sufre rápidas adaptaciones metabólicas, estructurales y bioquímicas en respuesta a los distintos ambientes que encuentra. Para alcanzar rápidamente estos cambios durante la transición de estadios, debe poder controlar estrictamente la expresión de sus genes. A pesar de esta estricta regulación, la transcripción de genes es policistrónica, donde los genes que se transcriben juntos no tienen necesariamente una asociación funcional, esto significa que no hay regulación individual de la expresión de genes al comienzo de la transcripción [29]. Esta organización probablemente explica por qué se han encontrado tan pocos promotores en los genes de tripanosomátidos. A pesar que la

transcripción es policistónica, los genes que se transcriben juntos tienen niveles de ARN mensajero (ARNm) muy diferentes lo cual refleja que la regulación de la expresión génica es principalmente post transcripcional. Estos mecanismos incluyen el procesamiento y degradación del ARN mensajero, eficiencia de la traducción, procesamiento, estabilidad y degradación proteica [30].

Se ha demostrado una variación en la abundancia de transcritos durante la transición de estadios en *T. brucei* (cerca del 25%) [31], en *T. cruzi* (entre el 15 y el 50%) [32, 33] y en *Leishmania* (alrededor del 70%) [34]. Así, parte de los estudios presentados en esta tesis parten del supuesto que el análisis de los transcriptomas en estos parásitos, es decir el conjunto de genes expresados a nivel de ARN en un momento dado, puede brindar información importante acerca de los cambios estadio específico. Dentro de los mecanismos de regulación post-transcripcional, uno de los más relevantes es el control de la estabilidad mediada por las regiones 3' no traducidas (3' UTR) y proteínas de unión que estabilizan o desestabilizan al ARN mensajero[35]. Otro de los mecanismos que ha mostrado tener un impacto importante en la regulación de la expresión génica, es el control a nivel de la traducción [36, 37]. Aunque el control a nivel postraduccional es seguramente también muy importante, no existen estimaciones de su magnitud relativa.

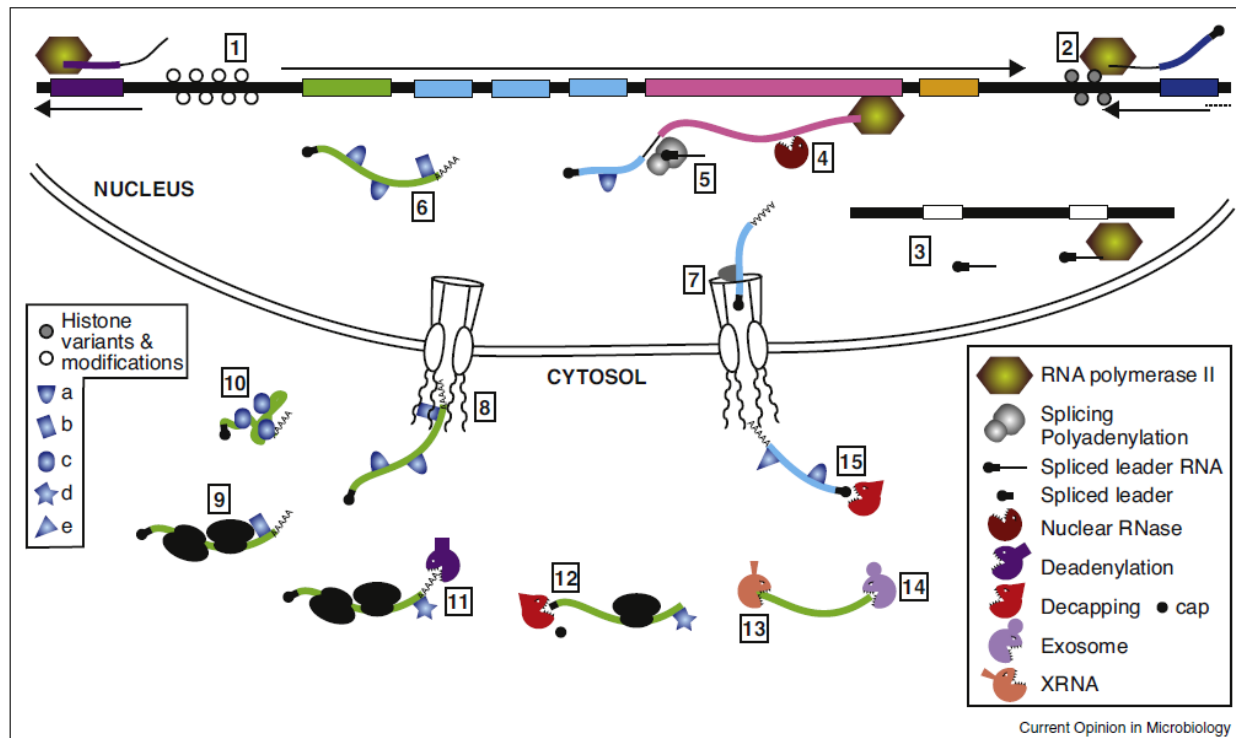


Figura 3: Expresión génica y sus puntos principales de regulación en kinetoplastidos. Extraído de [3]

Como se puede ver en la Figura 3, la regulación de la expresión génica es realmente muy compleja e involucra distintos eventos tanto en el núcleo como en el citoplasma, revisado por Clayton [3].

Si bien durante mucho tiempo se pensó que la regulación en tripanosomátidos era exclusivamente postranscripcional, más recientemente se describieron mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica a nivel epigenético, principalmente en los puntos denominados regiones de cambio de hebra (SSR) [38]. Esta regulación epigenética involucra la presencia de bases modificadas, la modificación de histonas y la abundancia de nucleosomas [39].

Inmunidad contra *Trypanosoma cruzi*

Como se mencionó previamente, en el hospedero definitivo mamífero el parásito se presenta en una forma circulante extracelular así como una forma intracelular. Ambas están sometidas a la presión del sistema inmune hospedero que intenta eliminarlas. Si bien el hospedero logra controlar parcialmente la infección, el parásito logra permanecer durante décadas, lo que implica que el parásito presenta mecanismos de evasión del sistema inmune que le permiten la persistencia.

Durante el ingreso al hospedero mamífero de la forma infectiva (tripomastigotas metacíclicos), los parásitos invaden y se replican en distintas células cercanas al sitio de infección, entre ellas células epiteliales, fibroblastos y también macrófagos. El ingreso está mediado por distintas moléculas de superficie que participan en la adhesión, así como una cascada de señalización en la célula hospedera y en el parásito que involucra un aumento del calcio intracelular y un movimiento de lisosomas hacia el sitio de entrada del parásito [40]. En el sitio de entrada, los macrófagos y las células dendríticas pueden ser infectadas y tras el reconocimiento de distintas moléculas del parásito conocidas como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) a través de los receptores celulares PRR, (receptores de reconocimiento de patrones) producir una respuesta celular innata contra el patógeno [41]. Dentro de los receptores de reconocimiento de patrones, los más conocidos son los receptores del tipo Toll (TLRs) los cuales funcionan a través de distintas moléculas adaptadoras como MyD88 o TRIF [42]. La resistencia del hospedero a la infección por *T. cruzi* depende de la producción de las citoquinas proinflamatorias por células dendríticas y macrófagos, principalmente la producción de IL12 y TNF mediada por MyD88 y de IFN β mediada por TRIF [43].

Dentro de las estructuras de superficie del parásito reconocidas por los receptores TLR, se encuentran las moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI), las cuales anclan a las glicoproteínas de superficie a la membrana y las de glicoinositolfosfolípido (GIPL). En particular se demostró la gran capacidad de las

GPI purificadas de mucinas de tripomastigotas de inducir la señalización a través de TLR2 [44], y las de los GIPL como agonistas del TLR4 mediando la inducción de mediadores inflamatorios [45]. La molécula Tc52 liberada por el parásito, es capaz de activar macrófagos [46] y células dendríticas [47] mediante el TLR2, así como el ADN de *T. cruzi* mostró la capacidad de inducir señalización por TLR9 [48]. Se ha demostrado que la inducción de IFN, IL12 y otras citoquinas proinflamatorias mediada por TLR y en particular por MyD88, es de gran importancia para el control inmune de la enfermedad de Chagas; animales knockout para el gen MyD88 (MyD88 KO) mostraron una clara disminución en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF e IFN), así como un aumento en la susceptibilidad a infección por *T. cruzi* (mayor parasitemia y mortalidad) [49].

Durante la infección aguda, la acción microbicida de los macrófagos es central en el control de la enfermedad y depende de su activación mediada por diferentes señales. Dentro de las señales que llevan a un control adecuado de la replicación intracelular del parásito, se demostró que el IFN γ secretado por células natural killers (NK) y linfocitos T juega un rol fundamental. La IL12 secretada por los macrófagos infectados es capaz de inducir la liberación de IFN γ por células T y NK [50], mientras que las citoquinas TGF β e IL10 están asociadas a la inhibición de la activación de los macrófagos mediada por IFN γ , aumentando la susceptibilidad a la infección [51]. De esta manera, dependiendo de las citoquinas presentes en el entorno, los macrófagos presentan un fenotipo de activación clásica (o M1) inducido principalmente por IFN γ , o alternativo (o M2) inducido principalmente por IL4 e IL13 [52]. La acción microbicida del IFN γ en el control de la replicación del parásito es dependiente de la producción de óxido nítrico (NO) por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en estas células [51], así como también de peroxinitrito (ONOO $\cdot$) el cual mostró ser citotóxico para el parásito. El ONOO $\cdot$ se forma tras interacción del NO (formado por la iNOS inducida por IFN γ y TNF α) y el radical superóxido O $_2^{\cdot-}$ (formado por el complejo NADPH oxidasa) en los fagosomas [53]. A pesar de ello, *T. cruzi* presenta mecanismos que le permiten protegerse de la toxicidad de estas moléculas, entre ellas las peroxirredoxinas y la ascorbato peroxidasa [54, 55].

La resistencia del hospedero contra la infección por *T. cruzi* involucra tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa, con la participación de distintos tipos celulares efectores incluyendo células natural killer (NK), linfocitos T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ así como la producción de anticuerpos por los linfocitos B [41]. Las células NK mostraron ser relevantes en el control de la parasitemia durante la fase aguda de la infección [56]. Así como en el caso de otros parásitos intracelulares, los linfocitos T CD8 $^+$ también juegan un rol central en el control de *T. cruzi* [57-59]. Se ha visto que las respuestas de linfocitos T CD8 $^+$ son dirigidas a

solo un pequeño grupo de epítopes inmunodominantes presentados en el contexto de las moléculas MHCI. Dentro de los más importantes se encuentran los codificados por la familia multigénica transialidasa (TS), pero también péptidos de cruzipaina, KMP11 [60] y beta galactosiltransferasa [61]. Más adelante nos centraremos en algunas de estas proteínas ya que juegan un rol importante en la evasión de la respuesta inmune del hospedero.

3. INTERACCIÓN PARÁSITO-HOSPEDADOR

Para el establecimiento de una infección exitosa, *T. cruzi* debe en primer lugar adherirse a las células para luego poder ser internalizado por distintos mecanismos. Las características de la interacción entre el parásito y las células hospederas dependen de distintos factores, entre ellos la cepa y el estadio del parásito así como el tipo celular infectado y el contexto genético del hospedador. Distintas moléculas de superficie del parásito y de las células hospederas, así como también factores secretados por ambos tipos celulares están involucradas en el proceso de infección [2, 62].

La interacción de *T. cruzi* con el hospedero mamífero es muy compleja e involucra diferentes moléculas de superficie y vías de señalización en ambos tipos celulares. La Figura 4 resume algunas de las moléculas (del parásito y de la célula) que han sido involucradas en la interacción en distintos tipos celulares, distintos estadios del parásito y diferentes cepas (revisado por de Souza [2]). Para poder presentar de forma ordenada algunas de estas moléculas en esta introducción, las hemos clasificado en: moléculas de superficie del parásito, moléculas secretadas por el parásito y moléculas de la célula hospedera, si bien muchas de las moléculas de superficie también son secretadas por las células.

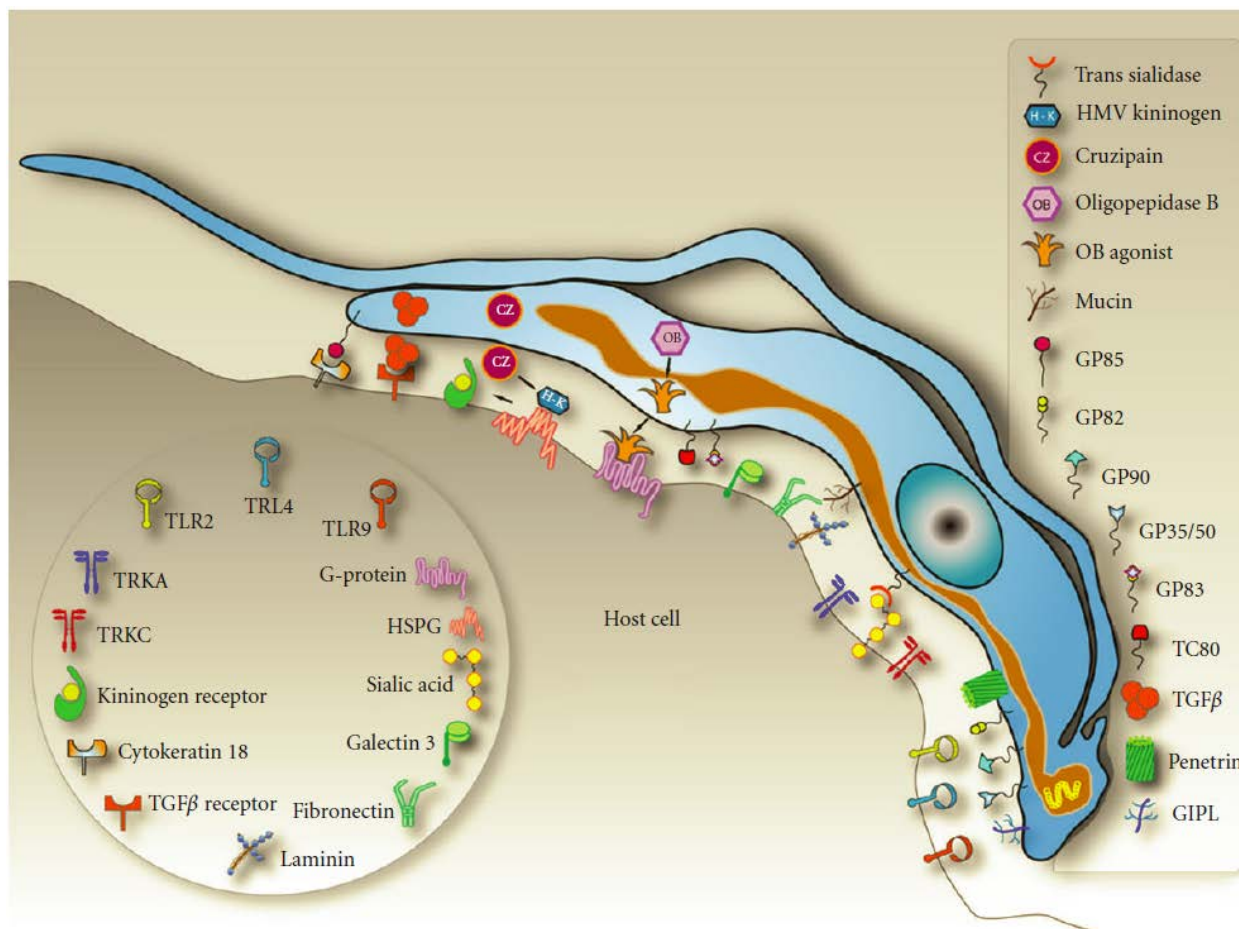


Figura 4: Modelo esquemático de la interacción entre un tripomastigota de *T. cruzi* y una célula humana. Extraído de [2]

Moléculas de superficie del parásito

Aproximadamente el 50% del genoma de *Trypanosoma cruzi* está formada por secuencias repetitivas, muchas de ellas debidas a la presencia de familias multigénicas y retrotransposones [63]. Dentro de las moléculas presentes en el parásito involucradas en la infección, las glicoproteínas de superficie como las TS/gp85, mucinas, “Mucin Associated Surface Proteins” MASP, así como la cruzipaina y oligopeptidasa B son las más relevantes [64].

Las transialidasas (TS) constituyen una superfamilia multigénica que se encuentra presente en kinetoplastidos como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma rangeli*, representada en *T. cruzi*

por más de 1400 parálogos [65]. Una de las funciones mejor caracterizadas de esta familia, es la actividad enzimática la cual consiste en la transferencia de residuos de ácido siálico desde glicoconjugados del hospedero hacia las mucinas del parásito [66]. Esto es importante ya que el ácido siálico no puede ser sintetizado por el parásito y la presencia de este residuo es importante para distintos aspectos de la infectividad parasitaria [67]. Este residuo cargado negativamente se encuentra presente en los carbohidratos terminales de glicoproteínas, donde debido a sus características, es capaz de influenciar muchos procesos de reconocimiento entre moléculas [68].

Las TS de tripomastigotas forman oligómeros heterogéneos, formados a partir de monómeros cuyos pesos moleculares oscilan entre 120 y 240 kDa, se encuentran ancladas a la superficie por una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) y contienen una región C-terminal con un repetido de 12 aminoácidos denominada SAPA (“shed acute phase antigen”) [67]. Estos repetidos SAPA aumentan la vida media de la proteína en sangre [69] y por otro lado inducen la producción de anticuerpos específicos contra la región C-terminal, evitando o retrasando la generación de anticuerpos contra la región catalítica de la enzima [70]. Una gran parte de los miembros de la familia TS son inactivos desde el punto de vista enzimático. Esta inactividad se debe a una sola sustitución aminoacídica en un residuo clave, la tirosina 342, sin embargo también se ha demostrado la relevancia de la prolina 332 para que la actividad enzimática sea completa [71]. Durante el estadio intracelular amastigota, la expresión de la TS disminuye significativamente, volviéndose a expresar cuando los amastigotas detienen su división para convertirse nuevamente en tripomastigotas [72].

Las mucinas de *T. cruzi* (TcMUC) están codificadas por una gran familia multigénica formada por cerca de 500 parálogos [73]. Todos los genes codifican proteínas con un péptido señal N-terminal y sitios de anclado a GPI en la región C terminal, mientras que la región central es altamente variable [74]. En un principio las mucinas se clasificaron en dos grandes grupos, aquellos que presentaban repetidos centrales con la secuencia T₈KP₂ (TcMUCI) y un segundo grupo con regiones N y C terminales conservadas pero con un dominio central altamente variable rico en Thr, Ser y Pro (TcMUCII) [75]. Otro grupo de mucinas se encuentra expresado en las etapas presentes en el insecto vector, los miembros de este grupo presentan regiones N y C terminales muy similares a TcMUC pero sus regiones centrales son muy cortas y particulares. A este grupo se le llamo TcSMUG y comprende unos 70-80 genes y dependiendo del largo de sus mensajeros se han identificado dos subgrupos: S y L [76].

Las mucinas cumplen diferentes funciones en cada estadio del parásito, en los estadios presentes en el insecto vector participan en la adhesión y en la defensa frente a la proteólisis. Por otro lado, en los estadios

presentes en el hospedero mamífero, las mucinas son de mayor tamaño y con mayor variabilidad en la secuencia de glicanos; sus roles están vinculados a la invasión y la evasión de la respuesta inmune [76].

Las MASP, del inglés “Mucin Associated Surface Proteins” constituyen una familia multigénica formada por más de 1200 parálogos, que se encuentran generalmente contiguos en el genoma a genes de mucinas (principalmente TcMUCII) y TS [77]. Las MASP están caracterizadas por presentar regiones N y C terminales conservadas que codifican para un péptido señal y un sitio de anclaje a GPI respectivamente, mientras que la región central es altamente variable y repetitiva. Se ha demostrado también que alguno de los miembros presentes en tripomastigotas se liberan al medio de cultivo y si bien su rol no ha sido elucidado completamente, se ha demostrado que al menos uno de los miembros de la familia, MASP52 es capaz de promover la infectividad a células de mamífero [78]. Debido a que son proteínas de superficie altamente polimórficas y que son capaces de secretarse al medio, se ha especulado con que además de tener un rol en la infectividad, las MASP juegan un rol en la evasión del sistema inmune. De hecho, se demostró que las MASP son antigénicas y que su perfil de expresión de génico varía entre tripomastigotas derivados de distintas líneas celulares y también al comparar estos tripomastigotas con los derivados de un modelo de infección aguda en ratón, lo cual sugiere un rol en la interacción con el sistema inmune del hospedero [79].

Junto con las principales proteínas de superficie pertenecientes a familias multigénicas, otras glicoproteínas de superficie han sido implicadas en la infección, tanto modulando positivamente como negativamente la invasión. Dentro de las moléculas que promueven la invasión se encuentra la glicoproteína gp82 que está codificada por varios genes [80]. La gp82 presenta una alta expresión en tripomastigotas metacíclicos y participa activamente en la interacción del parásito con la mucosa gástrica durante la infección oral [81, 82]. De manera contraria, la glicoproteína gp90 también está codificada por varios genes [83] y ha sido involucrada en la modulación negativa de la invasión a la mucosa gástrica [84]. A diferencia de lo que sucede con la unión de gp82 a células de mamíferos, la unión de gp90 no genera un aumento de la concentración de calcio en la célula hospedera (evento necesario para la invasión) y su inhibición mediante oligonucleótidos sintéticos antisentido mostró promover la invasión del parásito [85].

Factores secretados en la comunicación intercelular

En eucariotas, la mayoría de las proteínas secretadas contienen péptido señal en la región N-terminal, el cual las dirige a través de la vía secretoria hacia el exterior celular. Las proteínas que no contienen péptido señal, pueden ser secretadas por mecanismos no clásicos de secreción, como por ejemplo asociadas a

vesículas extracelulares (EVs), o directamente mediante su translocación desde el citoplasma hasta el exterior celular [86].

En *Trypanosoma cruzi* por otro lado, solo alrededor del 10 % de las proteínas secretadas presentan secuencia predicha para secreción clásica [87, 88], esto implica que la mayoría de las proteínas se secretan independientemente de la vía secretoria.

En los últimos años, el conocimiento acerca de la comunicación intercelular mediada por EVs ha aumentado considerablemente y actualmente las vesículas se clasifican según su tamaño y origen en exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Los exosomas tienen un tamaño entre 50-100 nm y son originados a partir de cuerpos multivesiculares, las microvesículas son un poco mayores, su tamaño varía entre 100 y 1000 nm y se originan de evaginaciones de la membrana plasmática, y por último los cuerpos apoptóticos tienen tamaños entre 1 y 5 μ m y se generan por evaginaciones de la membrana de células apoptóticas [89]. Tanto las microvesículas como los exosomas pueden transportar lípidos, ácidos nucleicos y proteínas de manera específica [90, 91].

La secreción de EVs ha sido bien documentada en tripanosomátidos como *Leishmania* [92] y *T. brucei* [93]; en ambos organismos el rol de las vesículas fue vinculado a la modulación de la respuesta inmune [94], a la promoción de la infectividad [95] así como a la transferencia de factores de virulencia al hospedero [96]. En cuanto al rol de las vesículas secretadas por *T. cruzi* en la patogenicidad, se ha demostrado *in vivo* la capacidad de las vesículas secretadas por tripomastigotas de aumentar la susceptibilidad a la infección mediante la inducción de una respuesta tipo Th2 [97]. En este organismo se han caracterizado dos subpoblaciones de EVs a partir de epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos cuyos tamaños y características peculiares difieren [87]. Se propuso en ese trabajo que las vesículas más grandes son generadas a partir de evaginaciones de la membrana plasmática (de forma análoga a las microvesículas) y que las más pequeñas se forman a partir de cuerpos multivesiculares (análogamente a los exosomas). Además de las dos poblaciones de EVs, también se describió un conjunto de proteínas secretadas solubles, identificadas en una fracción libre de vesículas. Muchas de las proteínas identificadas fueron ya caracterizadas como factores de virulencia, chaperonas, enzimas glucolíticas y factores de transcripción [87], por lo que se especuló con que los tripomastigotas metacíclicos son capaces de transferir información a su hospedero por este mecanismo. Si bien este fue el primer reporte de un análisis proteómico de las vesículas secretadas por *T. cruzi*, la liberación de proteínas y antígenos fue demostrada hace más de 20 años [98-101].

Más recientemente, se publicó el exoproteoma de tripomastigotas derivados de células. El término exoproteoma abarca todas las proteínas que se encuentran en la proximidad extracelular de un organismo en una condición dada, pero que no necesariamente son secretadas por el organismo. En este trabajo se identificaron más de 500 proteínas en el exoproteoma de la cepa Y, algunas de ellas presentan regiones transmembrana y pertenecen a la familia de las mucinas y las TS, mientras que otras tienen secuencia para anclaje a GPI como la gp63 y MASP [88]. Veremos a continuación algunas de las proteínas secretadas que participan en la interacción con el hospedero.

Transialidasas (TS)

Además del rol de las vesículas en la interacción con el hospedero, otras moléculas secretadas por el parásito han sido también caracterizadas en su rol de interactuar con el hospedero. Entre ellas las TS que pueden ser secretadas e interactuar con distintos receptores de las células hospederas, participando en procesos tales como la transducción de señales, la apoptosis y la inmunomodulación del hospedero [102]. Se ha demostrado que las TS son capaces de aumentar la sobrevivencia de neuronas y células gliales mediante la activación de la vía PI3K/Akt a través de su interacción con el receptor quinasa de tirosinas A (TrkA), de manera independiente de su actividad enzimática [103-105].

En cuanto a su interacción con linfocitos T, se ha demostrado la capacidad de TS (tanto miembros activos como inactivos) de inducir la activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺. Esta activación se produce mediante la unión de la TS con el receptor altamente sialilado CD43, y evita la muerte inducida por activación, lo cual probablemente esté relacionado con la inmunopatología de la enfermedad de Chagas [106]. Además de promover la sobrevivencia, se comprobó la capacidad de TS de inducir apoptosis en linfocitos T produciendo una depleción en el timo de este tipo celular así como de modular la diferenciación de timocitos a través de la activación de la vía de las MAPK aumentando la frecuencia de linfocitos T inmaduros [107].

Cruzipaina (Cz)

La cruzipaina (Cz) es una glicoproteína miembro de la superfamilia papaína, la cual se expresa en todos los estadios del parásito y se considera la cisteína proteasa más importante de *T. cruzi* [108]. La enzima activa es capaz de degradar inmunoglobulinas G humanas [109, 110], de digerir kininógenos y producir kininas y de la activación de receptores bradiquinina B2 [111], modulando la respuesta inmune del hospedero. La Cz ha sido involucrada en la invasión de macrófagos, ya que su neutralización con fragmentos f(ab)₂, impiden la entrada del parásito en este tipo celular [112]. Se ha demostrado por un lado

que los tripomastigotas son capaces de liberar kininas, producto de la degradación de kininogenos por Cz [113], y por otro lado, que las kininas son capaces de activar a las células dendríticas a través de sus receptores BR2 induciendo la secreción de IL12 e iniciando una respuesta tipo Th1 contra el parásito [114]. Este reconocimiento y activación de las células dendríticas es fundamental para el desarrollo de una respuesta antiparasítica efectiva [115]. La interacción de Cz con macrófagos mostró resultados variables: en la línea celular J774, Cz induce la expresión de la enzima arginasa I vía MAPK/p38 y crea un ambiente más permisivo para el parásito, incrementando su proliferación [116]. El análisis *in vivo* del rol de la Cz en la activación de la respuesta inmune del hospedero mostró resultados diferentes dependiendo de las características genéticas del hospedero. En animales BALB/c, la inmunización con Cz indujo una respuesta del tipo Th2 caracterizada por producción de IL4, IL5 e IL10 así como una activación alternativa de los macrófagos del bazo [117, 118]. Por el contrario, macrófagos provenientes de ratones C57BL/1 inmunizados con la proteína mostraron una activación clásica, mediada por la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y la secreción de TNF α [119]. Esto reflejaría por un lado la relevancia de esta proteína en inmunomodulación y en la patología de la enfermedad de Chagas, y por otro lado la importancia del acervo genético en las respuestas contra el parásito [120].

Triparredoxina peroxidasa

La enzima triparredoxina peroxidasa de *Trypanosoma cruzi* (TXNPx) pertenece a la familia de las proteínas antioxidantes peroxirredoxinas y cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a dos moléculas de agua, así como también la reducción de peroxinitrito (ONOO⁻) a nitrito (NO₂⁻) y agua [121, 122]. Este parásito cuenta con una forma mitocondrial mTXNPx y una forma citosólica cTXNPx de la enzima activas, cuya sobreexpresión le confiere resistencia a peróxidos agregados exógenamente [121]. El sistema antioxidante de *T. cruzi* en el que participan estas peroxirredoxinas es único ya que depende de un tiol de bajo peso molecular el dihidrotripanotión T(SH₂) (N(1),N(8)-bis (glutathionyl) spermidine) [123]. El tripanotión se mantiene en su estado reducido gracias a la enzima tripanotión reductasa (TR) la cual utiliza NADPH como cofactor. La triparredoxina peroxidasa recibe electrones de la enzima triparredoxina (enzima relacionada a las tiorredoxinas), la cual se mantiene en su estado reducido por el tripanotión [5, 121, 124-126] (Figura 5).

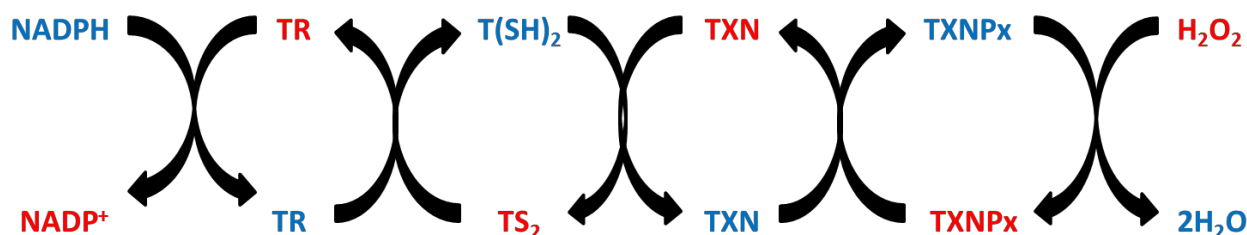


Figura 5: Esquema del sistema triparredoxina peroxidasa donde se muestran los componentes reducidos en azul y los oxidados en rojo. El sistema está formado por la enzima tripanotión reductasa (TR) la cual se mantiene en estado reducido a expensas del NADPH. La TR, reduce al tripanotión ($T(SH)_2$) de manera de que pueda transferir electrones a la triparredoxina (TXN), la cual reduce a la triparredoxina peroxidasa (TXNPx). Finalmente la enzima TXNPx es la que reduce el peróxido de hidrógeno H_2O_2 a agua.

Las peroxirredoxinas típicas de dos cisteínas (Cys) como las TXNPx de *T. cruzi* contienen dos residuos de cisteína que participan directamente de la actividad enzimática; un residuo Cys52 denominado cisteína peroxidática (localizado en la porción N-terminal de la cadena polipeptídica) y un residuo Cys 173, la cisteína resolutive la cual se localiza en la porción C-terminal de la cadena polipeptídica. La estructura básica funcional de esta enzima es un homodímero, aunque su estructura ha sido resuelta por nuestro grupo como homodecámero un (pentámero de dímeros) [5] (Figura 6).

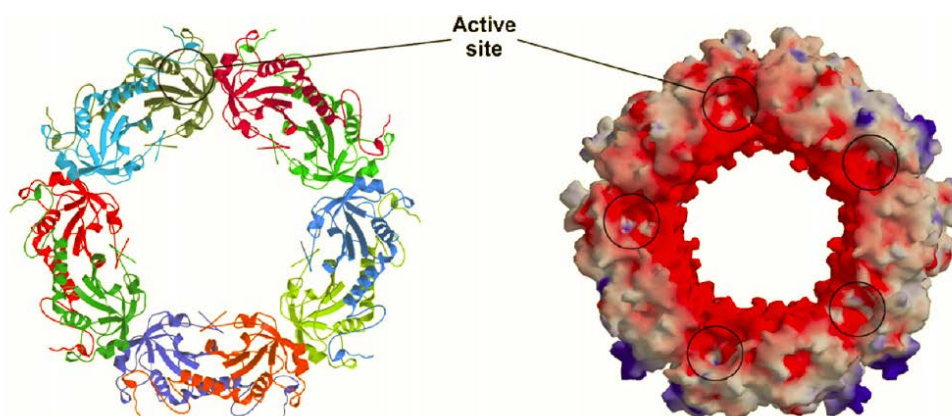


Figura 6: Estructura del decámero de la enzima cTXNPx de *Trypanosoma cruzi*, a la izquierda se muestra una representación en cintas donde cada monómero presenta un color diferente. A la derecha, el potencial electrostático de superficie graduado desde -10 kT (en rojo) hasta 10 kT en azul. Extraído de [5]

Durante la catálisis, el H_2O_2 oxida al grupo tiolato (-S⁻) de la cisteína N-terminal Cys52 a ácido sulfénico (SOH), posteriormente el SOH reacciona con la cisteína resolativa C173 de la subunidad vecina formando un puente disulfuro (S-S) intermolecular Cys52-Cys173', el cual es subsecuentemente reducido por la triparredoxina para reciclarla al estado inicial[127].

Debido a que durante el proceso inflamatorio se forman especies reactivas del nitrógeno y del oxígeno las cuales son capaces de generar citotoxicidad en el parásito [128, 129], la sobreexpresión de la TXNPs tanto citosólica como mitocondrial le confieren al parásito una resistencia aumentada durante la infección [54, 55]. Además del clásico rol como enzimas antioxidantes, más recientemente se comenzaron a describir otros roles de las peroxirredoxinas, por ejemplo como mediadores inflamatorios, factores inductores de la proliferación, chaperonas moleculares, entre otros [130]. Inclusive, se ha descrito recientemente la participación de las peroxirredoxinas en la regulación de la gluconeogénesis [131]. Finalmente, se ha demostrado la secreción de peroxirredoxinas de parásitos y de células de mamífero, las cuales son capaces de interactuar con células hospederas generando distintos tipos de respuestas [132-136].

Moléculas del hospedero involucradas en la invasión

Uno de los enfoques más utilizados para identificar genes involucrados en la susceptibilidad celular a la infección por *Trypanosoma cruzi* fue el uso de interferentes de ARN o ARNi, mediante técnicas de “screening” o rastreo de alto rendimiento [137, 138]. En uno de estos trabajos se identificaron 14 genes necesarios para la infección, algunos de ellos relacionados a la señalización mediada por TGF beta, otros son genes que codifican proteínas de la membrana celular (CABP2, CDH11, LOC401993, PCDHA13 y PRIMA1) y solo dos codifican para proteínas secretadas como la quimioquina CCL4L1 y el colágeno tipo VI COL6A6 [137]. En el segundo trabajo, se identificaron alrededor de 100 genes cuya interferencia modula el crecimiento intracelular, algunos de ellos vinculados al citoesqueleto fueron necesarios para la infección celular, otro grupo de genes relacionados al metabolismo energético fueron identificados como necesarios para sustentar la replicación de los amastigotas intracelulares [138].

En cuanto a las condiciones metabólicas celulares que afectan la replicación del parásito, se demostró en este trabajo que la interferencia de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK4) (enzima que inhibe por fosforilación a la piruvato deshidrogenasa) disminuye la replicación intracelular. Se ha propuesto que la enzima PDK4 juega un rol fundamental, modulando la utilización de glucosa o de ácidos grasos dependiendo de la condición metabólica de las células [139]. Los autores proponen que la disminución en la oxidación de ácidos grasos (modulada por PDK4) provoca una detención en la replicación de los

amastigotas [140]. Por último, también se demostró que el metabolismo de purinas, pirimidinas, pteridinas así como la actividad de la quinasa de serina Akt son fundamentales para el ciclo infectivo del parásito [140]. Es importante resaltar que en ninguno de estos ensayos de alto rendimiento usando interferencia fueron identificados genes relevantes para la infección previamente validados como la galectina 3, la citoqueratina 18, trombospondina 1, laminina $\gamma 1$ y el receptor de LDL [141-145].

Podemos concluir a partir de lo discutido anteriormente, que el proceso de infección por *T. cruzi* es muy complejo, involucra distintas moléculas y vías de transducción de señales en célula hospedera. Quizás es por esta complejidad que las diferencias experimentales (tipo celular, cepa del parásito, condiciones de infección) podrían llevar a grandes diferencias en los resultados obtenidos.

Internalización del parásito

Luego del reconocimiento y la adhesión del parásito a la superficie celular se da el proceso de internalización, el cual se puede dar por al menos 3 mecanismos diferentes. Uno de los mecanismos de entrada es la fagocitosis /macropinocitosis que ocurre en células fagocíticas profesionales y es dependiente de los filamentos de actina [146]. Otro de los mecanismos utilizados por el parásito para ingresar a las células hospederas es también dependiente de actina pero no involucra la formación de pseudópodos. Por último, los tripomastigotas también pueden entrar por invaginaciones en la membrana las cuales no involucran filamentos de actina. En este último mecanismo los parásitos ingresan a través de invaginaciones de la membrana enriquecidas en fosfatidilinositol -3- fosfato (PIP3). Independientemente del mecanismo de entrada, los parásitos se encuentran durante las primeras horas rodeados de una vacuola parasitófora que expresa marcadores de endosomas tardíos y de lisosomas [2]. En la Figura 7 se muestra un esquema de las diferentes vías de ingreso de los parásitos.

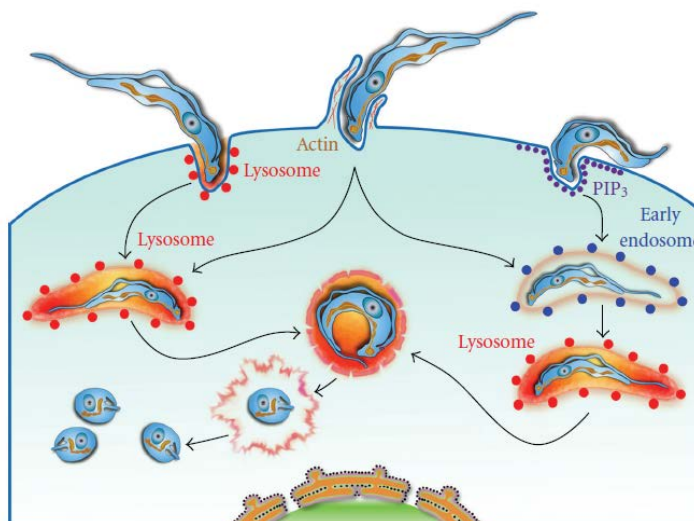


Figura 7: Modelo que muestra los distintos tipos de invasión de *T. cruzi* a células de mamíferos. Extraído de [2]

Respuesta transcripcional de células mamíferas infectadas con *Trypanosoma cruzi*

El uso de técnicas de alto rendimiento como los microarreglos de ADN o el secuenciado profundo, han sido muy utilizadas para analizar cambios globales a nivel transcriptómico en modelos de infección. En el caso de la infección por *Trypanosoma cruzi*, la respuesta transcriptómica global frente a la infección fue analizada tanto en modelos *in vivo* [147] como en modelos *in vitro* [148-150] utilizando distintos tipos celulares. Además de la utilización de distintos modelos para estudiar la respuesta a *T. cruzi*, existe una heterogeneidad en la literatura con respecto a la cepa del parásito utilizada, al tiempo de interacción, la multiplicidad de infección y el tiempo post infección evaluado. Esto hace difícil la comparación de las respuestas, sin embargo en algunos casos, al observar las vías principales afectadas durante la infección encontramos que muchos de los procesos son comunes en los diferentes modelos de estudio utilizados.

Debido a que una de las manifestaciones más severas de la enfermedad es la cardiomiopatía chagásica, varios de los estudios transcriptómicos de respuesta han sido evaluados tanto en corazones de animales infectados [151, 152] como en cultivos de cardiomiocitos [148, 153]. Dentro de los modelos *in vivo*, el estudio del transcriptoma de corazones provenientes animales chagásicos crónicos, mostró severas alteraciones. Dentro de los procesos más alterados se encontraron aquellos relacionados con la inflamación, proliferación y estructura del citoesqueleto [152]. Por otro lado, el análisis de vías enriquecidas en genes subexpresados en la infección, mostró una predominancia de procesos relacionados con la función de la mitocondria, con la señalización intracelular mediada por quinasas de tirosinas entre otros [152]. Hay que destacar que al tratarse de un modelo *in vivo* existe una heterogeneidad celular, por lo tanto además de los cardiomiocitos existe una importante representación de células inflamatorias (como macrófagos y linfocitos T), lo que podría explicar la gran sobreexpresión de quimioquinas e interleuquinas. En este trabajo también se observó una alteración de componentes de la matriz extracelular los cuales podrían contribuir a la cardiopatía chagásica [152].

En otro trabajo se estudió *in vivo* la transición entre la fase aguda y crónica de la enfermedad, utilizando un modelo conocido de enfermedad de Chagas crónico en ratón [151]. El análisis de los genes diferencialmente expresados en corazones de ratones infectados, reveló una inducción de genes relacionados con respuesta inmune y del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII). A pesar de no haber detectado directamente inducción de IFN γ , sí se demostró la sobreexpresión de genes inducidos por IFN γ como los IRF 1 y 5 una GTPasa que participa activamente en la defensa contra patógenos intracelulares. Se encontró sobreexpresión de genes que codifican factores de crecimiento como FGF, EGF y TGF y sus receptores, y alteración de genes de ciclinas que sugieren alteraciones en el ciclo celular

[151]. En este trabajo [151] también se encontró expresión diferencial de genes asociados a la estructura del citoesqueleto como se reportó previamente [152]

Si bien el estudio *in vivo* a nivel transcriptómico de un modelo crónico de enfermedad de Chagas aporta mucha información, para conocer la repuesta exclusiva de los cardiomiocitos se han realizado experimentos *in vitro* en modelos más simples utilizando cardiomiocitos primarios murinos [148, 153].

Unos de los primeros trabajos donde se estudió la respuesta de cardiomiocitos a la infección por *T. cruzi*, fue el del grupo de Krieger y Buck donde estudiaron las alteraciones tempranas, medias y tardías inducidas por el parásito [153]. Este trabajo mostró que existe una gran respuesta con reprogramación de la expresión génica en cardiomiocitos infectados, donde muchas vías relacionadas con la inflamación, apoptosis y remodelación del citoesqueleto mostraron una alteración. En ese trabajo se encontró que las células infectadas tenían alteración de la expresión de genes que codifican miembros de la cadena respiratoria mitocondrial [153]. Al comparar estos resultados con los obtenidos en el modelo *in vitro* de infección tardía [148], vemos resultados similares; genes relacionados a una respuesta inmune y apoptosis fueron sobreexpresados, así como también genes de respuesta a estrés, estructura del citoesqueleto y matriz extracelular.

Además de los cardiomiocitos, otros tipos celulares fueron estudiados en el contexto de la infección; como fibroblastos, células endoteliales, células del músculo liso, macrófagos y células epiteliales. En fibroblastos y células endoteliales, se estudió la respuesta a la infección por el parásito independientemente de las citoquinas presentes en el medio [154]. Este trabajo reveló que una gran parte de la respuesta celular observada es debida a factores presentes en el medio de cultivo más que a la internalización del parásito. Tanto en la línea de fibroblastos HFF como en células endoteliales HUVEC infectadas, se observó una subexpresión de genes que codifican proteínas vinculadas al ciclo celular y en particular a la regulación de la mitosis. Mediante ensayos de incorporación de BrdU pudieron demostrar que existe un factor mitótico que induce la proliferación en células vecinas a las infectadas, sin embargo las células que contenían parásitos mostraron un bloqueo en el progreso del ciclo celular, en particular de la citocinesis [154].

Junto con las alteraciones en el ciclo celular, genes que participan en la síntesis de coenzima A como pantotenatoquinasa 2 (PANK2) y en el catabolismo de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) disminuyeron su expresión en la infección [154].

Estos resultados difieren significativamente de los reportados por Vaena de Avalos, quienes mostraron que la infección temprana por *T. cruzi* (menos de 24 horas) involucra una mínima modulación de la respuesta celular [150].

Más recientemente con el uso de técnicas de secuenciado masivo, se realizó el primer transcriptoma dual de fibroblastos HFF infectados a diferentes tiempos, lo cual reflejó la gran cantidad de alteraciones transcripcionales que se producen tanto en la célula infectada como en el parásito [32]. En concordancia con los resultados obtenidos para otros tipos celulares, las principales alteraciones a nivel transcripcional en fibroblastos infectados estaban vinculados a una respuesta inmune (principalmente genes de respuesta a interferón tipo I (IFNI)), alteraciones en la progresión del ciclo celular pero también en el metabolismo lipídico de la célula hospedera [32].

En células epiteliales, el estudio de la respuesta tardía durante la infección reveló que tan solo 64 genes se encuentran diferencialmente expresados. La función de estos genes está relacionada con la respuesta inmune, principalmente interleuquinas IL6, IL8 e IL11 y con la proliferación celular. A diferencia de resultados reportados previamente [154, 155], en este trabajo se indica que la infección por *T. cruzi* induce una disminución en la proliferación celular [149], la respuesta temprana en este tipo celular aún no ha sido dilucidada.

D. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos de interacción entre *Trypanosoma cruzi* y células de mamífero, analizando tanto el impacto de la infección a gran escala mediante alteraciones transcriptómicas en células hospederas y del parásito, así como la interacción mediada por factores liberados por el parásito

E. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Determinar cambios transcripcionales globales en células humanas infectadas con *T. cruzi*
- 2- Identificar vías o moléculas necesarias para la infección.
- 3- Determinar cambios en el transcriptoma de *T. cruzi* durante el ciclo de vida del parásito.
- 4- Determinar las características metabólicas de los estadios que interactúan con el hospedero vertebrado e invertebrado.
- 5- Estudiar la composición proteica de vesículas extracelulares secretadas por el parásito y su interacción con células humanas.
- 6- Estudiar la secreción de la triparredoxina peroxidasa de *Trypanosoma cruzi*.
- 7- Analizar cómo se produce y cuál es el impacto de la interacción entre una la Triparredoxina peroxidasa de *Trypanosoma cruzi* y las células hospederas tanto *in vitro* como *in vivo*.

F. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

Parásitos

Durante este trabajo se utilizó el clon Dm28c de *Trypanosoma cruzi* que se clasifica como DTU I (“Discrete Typing Units”) en el sistema de clasificación de unidades de tipificación discretas [156].

El estadio epimastigota fue cultivado a 28°C en medio “Liver Infusion Tryptose” LIT (NaCl 68mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 30mM, Glucosa 11mM, Infusión de Hígado 3g/L, Triptosa 5g/L, Hemina 25mg/L pH 7,2) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) (Thermo SCIENTIFIC), Penicilina G 100 U/mL (Thermo SCIENTIFIC) y Estreptomicina 100 µg/mL (Thermo SCIENTIFIC). La diferenciación de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos o metaciclogénesis se realizó en medio TAU como se describió previamente [157]. Los tripomastigotas derivados de células fueron obtenidos a partir de sobrenadantes de monocapas de células Vero infectadas. Por último, para la obtención de amastigotas axénicos, los tripomastigotas se incubaron a 37°C en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) durante 48 h.

Células de mamífero

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares: Vero, HeLa HFF, Fibroblastos ATM -/- y J774 (ATCC) las cuales fueron cultivadas en medio DMEM (Thermo SCIENTIFIC) suplementado con SBF (Thermo SCIENTIFIC), Penicilina G 100 U/mL (Thermo SCIENTIFIC) y Estreptomicina 100 µg/mL (Thermo SCIENTIFIC).

Además de las líneas celulares, también se utilizaron macrófagos peritoneales obtenidos de ratones BALB/c. Para ello, 3 ratones hembras de la cepa BALB/c fueron sacrificados por dislocación cervical. A partir de un corte en la zona abdominal, se realizó un lavado intraperitoneal con PBS estéril y frío recolectando células de la cavidad peritoneal (PEC). Las PEC recolectadas fueron centrifugadas y colocadas en frascos de cultivo con medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Thermo SCIENTIFIC) para su adherencia por 18 h a 37°C [158]. Para los ensayos *in vitro* se utilizó la población de células adherentes enriquecidas en macrófagos.

2. PURIFICACIÓN Y PROTEÓMICA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Vesículas de epimastigotas

Los epimastigotas fueron crecidos en 200 mL de medio LIT hasta alcanzar una densidad de 10^8 parásitos/mL (fase exponencial tardía). Posteriormente fueron centrifugados a 2800 rpm por 10 min, lavados en PBS una vez y sometidos a estrés nutricional en medio RPMI (sin suero) durante 24 h a 28°C, como se describió previamente [159]. Pasadas las 24 h, los parásitos fueron centrifugados por 15 min a 3000 rpm, se retiró el sobrenadante y se centrifugó a 14000 g por 30 min. El *pellet* de esta centrifugación se denominó P1 y el sobrenadante SN1. El sobrenadante SN1 se sometió a ultracentrifugación a 100000 g por 90 min, el sobrenadante SN2 se conservó como la fracción libre de vesículas y el *pellet* conteniendo las vesículas fue lavado con PBS y centrifugado nuevamente a 100000 g durante 90 min. El *pellet* lavado fue resuspendido en 100 µL de PBS.

Vesículas de tripomastigotas

Para la purificación de vesículas extracelulares de tripomastigotas, 20×10^6 parásitos fueron incubados durante 2 h en PBS con glucosa 5 % y luego centrifugados a 3500 rpm durante 15 min. Se colectó el sobrenadante conteniendo las vesículas extracelulares el cual se centrifugó a 14000 g por 30 min para remover restos celulares. De esta centrifugación se recuperó el sobrenadante que luego se re centrifugó a 100000 g por 90 min. Las vesículas presentes en el *pellet* fueron lavadas con PBS y centrifugadas nuevamente a 100000 g. El *pellet* se resuspendió en *buffer* Laemmli [160] para su evaluación por Western blot.

3. ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES

Las vesículas aisladas a partir de epimastigotas fueron resuspendidas en 100 µL de agua y purificadas con el *kit* “2D Clean-Up Kit” (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente, el *pellet* se resuspendió en 80 µL de buffer bicarbonato pH 8,0 con hidrocloreuro de guanidina 2 M. La muestra fue reducida mediante el agregado de Ditiotreitól (DTT) 100 mM e incubación a 56°C durante 1 h en agitación. Luego de este período la muestra fue alquilada mediante el agregado de 15 µL de iodoacetamida (IAM) 300 mM e incubación durante 45 min a temperatura ambiente (T. amb.) en oscuridad. Luego del control de pH las muestras fueron digeridas con 1 µg de tripsina durante 18 h a 37°C e inyectadas en un Espectrómetro de

masa LTQ Velos + ETD, Thermo. El análisis de los péptidos fue realizado por la Dra. Adriana Parodi en colaboración con el Dr. Carlos Batthyány de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas.

Se analizaron cinco experimentos diferentes, de los cuales 4 fueron réplicas biológicas independientes considerándose presentes las proteínas identificadas en al menos dos experimentos diferentes.

4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

De transmisión

Para la tinción negativa, las vesículas extracelulares fueron adsorbidas en grillas de níquel tratadas con Formvar 0,5 %/Carbono durante 20 min, posteriormente fueron lavadas en PBS y teñidas con molibdato de amonio 1 % por 30 seg.

Para el inmunomarcado, las grillas fueron fijadas con paraformaldehído 2 % por 30 min a T. amb. y luego incubadas con NH_4Cl 50 mM en PBS por 5 min. Las grillas fueron bloqueadas con BSA 5 % en PBS por 10 min y permeabilizadas con BSA 1 % Saponina 0,1 % en PBS por 5 min. Posteriormente las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti cTXNPx diluido en solución de bloqueo (1/200) por 30 min, lavadas e incubadas nuevamente con un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a partículas de oro de 10 nm (Sigma- Aldrich, USA). Luego de los lavados las grillas fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 en el Centro Nacional de Biología Estrutural e Bioimagem (CENABIO), de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brasil.

De barrido

Epimastigotas control o estresados nutricionalmente en medio RPMI por 24 h y tripomastigotas control o incubados en PBS por 2 h fueron fijados con glutaraldehído 2 % en buffer cacodilato 0,1M pH 7,4 por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras fueron lavadas con buffer cacodilato con sacarosa 300 mM tres veces y fijadas con OsO_4 1 % por 1 h. Luego de 3 lavados con tampón cacodilato con sacarosa, las muestras fueron deshidratadas crecientemente con 30, 50, 70, 90, 96, 100 % de etanol y lavadas 2 veces con etanol absoluto durante 10 min. Posteriormente, las muestras fueron desecadas al punto crítico, colocadas en soportes para microscopio electrónico de barrido y recubiertas con oro metálico en atmósfera de argón. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO 10 en el Centro Nacional de Biología Estrutural e Bioimagem (CENABIO), de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brasil.

5. TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Para la transfección de células HeLa, 6×10^4 células/ pocillo fueron sembradas en placas de 24 pocillos y a las 24 h fueron transfectadas con 300 ng de plásmido reportero para IL8 y sus mutantes correspondientes (IL8Luc, NF- κ Bmut, AP-1mut, Nf-IL6Mut), plásmido reportero para NF- κ B (PRD2), o 50 ng del plásmido β -Galactosidasa como control de transfección. Estos plásmidos fueron cedidos por el Dr. Michael Parkhouse del Instituto Gulbenkian, Portugal [1]

La transfección se realizó incubando una mezcla del ADN con 1 μ L de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y las células durante 4 h. Luego de este período las células fueron lavadas e incubadas con DMEM 10 % SBF para los tratamientos posteriores.

6. MEDIDA DE LUCIFERASA Y DE β GALACTOSIDASA

Para las medidas de la actividad luciferasa se utilizó el *kit* “Luciferase Assay System” (Promega) el cual cuenta con un *buffer* de lisis, un sustrato de luciferasa y un *buffer* óptimo para el ensayo. Los extractos fueron obtenidos mediante el agregado y resuspensión de 50 μ L de *buffer* de lisis por pocillo (en placas de 24 pocillos). Se realizaron las mezclas de los extractos con los reactivos siguiendo las instrucciones del fabricante y la luminiscencia fue medida en un luminómetro LUMistar OPTIMA, BMG labtech.

La medida de β -galactosidasa se realizó incubando 5 μ L de extracto obtenido previamente con 100 μ M de CPRG (Sigma Aldrich, USA) diluido en *buffer* Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 10 mM, β mercaptoetanol 50 mM pH *buffer* 7,3) en placas de 96 pocillos (100 μ L/pocillo). Las placas se incubaron a 37°C hasta el desarrollo de color y la reacción se detuvo con 60 μ L de Na_2CO_3 1 M. La absorbancia fue medida a 595 nm en un lector de placas.

La cuantificación de proteínas fue realizada en placas de 96 pocillos por el método de Bradford [161].

La medida de luminiscencia para cada pocillo fue normalizada con la actividad β -galactosidasa de cada condición y expresada en unidades por mg de proteína del extracto.

7. ENSAYOS DE INFECCIÓN

Para los ensayos de infección las células HeLa o Vero fueron tripsinizadas, contadas y depositadas a una densidad de 5×10^5 , 5×10^4 o $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 6, 12 o 24 pocillos respectivamente. A las 24 h se realizó la infección con tripomastigotas derivados de células frescos a una relación parásito :

célula de 5:1 en medio DMEM con 2 % de SBF durante 4 h. Luego de este período, los parásitos se removieron y las células fueron lavadas tres veces con PBS.

8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para la extracción de proteínas de células de mamífero, estas fueron lavadas con PBS y lisadas directamente sobre el pocillo con 100 μ L (para 9,5 cm²) de buffer de lisis RIPA (Tris HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 1 %, desoxicolato de sodio 1 %, SDS 0,1 %) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) y de fosfatasas “PhosStop” (Roche). El lisado fue congelado a -80°C durante dos horas y luego centrifugado a 15000 g por 10 min. El sobrenadante fue utilizado inmediatamente o preservado a -80°C.

9. ELECTROFORÉISIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT

Para el análisis por Western blot, 20 μ g de proteínas fueron separados por electroforesis SDS-PAGE en geles de gradiente de 4 a 12 % comerciales (Invitrogen) o geles de acrilamida al 12 %. La corrida electroforética fue realizada en buffer Tris-Glicina con SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 %, pH 8,6) a 200 V durante 2 h.

Luego de la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa “Hybond ECL” (GE Healthcare Life Sciences) durante 17 h a 40 V o 3 h a 100 V y 300 mA en buffer de transferencia Tris-Base 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0,0375% (p/v), 20% (v/v) etanol. Luego de la transferencia, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar las proteínas y bloqueadas con PBS con leche descremada al 5 % o con Albúmina Sérica Bovina (BSA) 5% (Sigma- Aldrich, USA) dependiendo del anticuerpo primario. Las membranas se lavaron con PBS Tween 0,1 % (PBST) dos veces por 5 min cada una. Luego de los lavados, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios a sus diluciones correspondientes en PBS-BSA 0,1 % Tween 0,1 % durante 1 h a T. amb. o durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con PBST de 5 min cada uno para luego incubar las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente. El anticuerpo anti ratón conjugado a peroxidasa (Dako) fue usado a una dilución 1/10000 y el anticuerpo anti conejo conjugado a peroxidasa 1/7000 (Sigma- Aldrich USA) en PBS-BSA 0,1 % Tween 0,1 %. Luego de la interacción de 1 h con el anticuerpo secundario, las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS y reveladas utilizando el *kit* “Kit Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate” (Thermo SCIENTIFIC).

La siguiente Tabla muestra los anticuerpos utilizados y las diluciones correspondientes.

Anticuerpo	Marca	Dilución
anti-H2AX-P	Cell Signalling	1/1000
anti-cTXNPx	no comercial	1/5000
anti-ERK	Cell Signalling	1/1000
anti-ERK-P	Cell Signalling	1/2000
anti-GAPDH	Sigma	1/5000
anti-OLR1	Santa cruz	1/1000
anti-PTGS2	Santa cruz	1/500
anti-tubulina	Sigma	1/5000

10. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las construcciones y clones utilizados durante este trabajo fueron generados por la Dra. Dolores Piñeyro de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo [126].

Los clones transformados con la construcción pQE30-cTXNPx, pQE30-cTXNPxC52S y pQE30 (control Mock, sin el inserto) fueron crecidos en 50 mL de medio LB con Ampicilina 50 µg/mL y Kanamicina 25 µg/mL toda la noche a 37°C. Al día siguiente, los 50 mL de cultivo se inocularon en 1 litro de medio LB y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6. La expresión de las proteínas se indujo mediante el agregado de IPTG 0,5 mM e incubación por 4 h a 30°C.

Luego de la inducción las bacterias fueron cosechadas por centrifugación, lisadas y purificadas como se describió previamente [162], pero con algunas modificaciones. Brevemente, la purificación fue realizada en una columna de afinidad “HiTrap” (Amersham) cargada con Niquel y equilibrada en *buffer* de unión (Fosfato de sodio 50 mM, Imidazol 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7,6). El lisado de bacterias fue recirculado por la columna equilibrada durante dos horas a 4°C y luego de los lavados con 10 volúmenes de *buffer* de lavado 1 (Fosfato de sodio 50 mM, Imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, pH7,6) y 5 volúmenes de *buffer* de lavado 2 (Fosfato de sodio 50 mM, Imidazol 50 mM, NaCl 500 mM, pH7,6), la elución se realizó con 10 volúmenes de *buffer* de elución (Fosfato de sodio 50 mM, Imidazol 400 mM, NaCl 500 mM, pH7,6) en alícuotas de 3 mL.

La pureza de los eluidos fue evaluada mediante electroforesis SDS-PAGE donde se corrieron las diferentes fracciones de la purificación. Los eluidos que contenían proteína pura fueron juntados, concentrados y dializados con buffer Hepes100 mM, NaCl 50 mM pH 7,4.

Alternativamente se utilizó cTXNPx libre de endotoxinas expresada en la cepa bacteriana ClearColi (Lucigen) la cual fue purificada por la Lic. Lucia López de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

Remoción de endotoxinas

Las endotoxinas de las muestras de proteínas recombinantes fueron removidas utilizando columnas de remoción de endotoxinas (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificadas utilizando el *kit* de cuantificación de endotoxinas “Limulus Amebocyte Lysate (LAL)” (Thermo SCIENTIFIC)

Conjugación al fluoróforo

Las proteínas purificadas y libres de endotoxinas cTXNPx, cTXNPxC52S y mTXNPx fueron dializadas en buffer bicarbonato 0,1 M pH 8,2 y llevadas a una concentración de 3 mg/mL. Las proteínas fueron conjugadas a Atto647N (Sigma Aldrich, USA) (λ_{ex} 644 nm; λ_{em} 661 nm) en su extremo amino terminal mediante la incubación del fluoróforo con la muestra a una relación molar fluoróforo: proteína de 2:1. La mezcla se incubó por 1 h a 4°C en agitación y el exceso de fluoróforo no unido fue removido por diálisis contra *buffer* Hepes 100 mM, NaCl 50 mM pH 7,4. Las proteínas fueron concentradas y dializadas con *buffer* Hepes 100 mM, NaCl 50 mM pH 7,4 y la cuantificación y la eficiencia de marcado fue evaluada por espectrofotometría midiendo la absorbancia a λ 280 nm y a λ 644 nm respectivamente.

11. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Para los ensayos de IFI, las células a analizar fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % en PBS por 20 min, permeabilizadas con tritón 0,5 % por 5 min e incubadas con NH_4Cl 50 mM por 10 min todo a T. amb.. Posteriormente, las células fueron bloqueadas con BSA 2 % en PBS durante 1 h a T. amb. y luego lavadas una vez con PBST. Las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en PBS BSA 2 % durante 1 h a 37°C o toda la noche a 4°C dependiendo del anticuerpo. Los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con PBST e incubados con el anticuerpo secundario (α conejo o ratón conjugado a Alexa 488, Invitrogen) diluido 1/800 en PBS 1 % Tween 0,1 % por 50 min a T. amb. y lavadas 4 veces con PBST. Para la tinción de lípidos neutros, las células fueron incubadas por 10 min a 37°C con Rojo Nilo (Sigma Aldrich, USA) a 500 nM y luego lavadas con PBS. Para la tinción de membranas celulares, las células fijadas fueron incubadas a temperatura ambiente por 5 min con “CellMask” TM (ex/em 649/666 nm) (Life Technologies) a una concentración final de 2 μ g/mL.

Los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos utilizando Fluoroshield con 4',6-Diamidino-2'-fenilindol dihidrocloruro (DAPI) (Sigma Aldrich, USA) y visualizados en un microscopio confocal LeicaDMI6000, TCS-SP5 o en un microscopio de superresolución ZeissElyra PS.1 en el Centro Nacional de Biología Estructural e Bioimagen (CENABIO), de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, Brasil.

La siguiente Tabla muestra los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Marca	Dilución
anti cTXNPx	no comercial	1/3000
anti-BrDU	Santa cruz	1/50
anti-LAMP1	Santa cruz	1/100
anti-Rab11	Cell Signalling	1/100
anti-Rab7	no comercial	1/100

12. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se utilizó para estudiar la interacción de cTXNPx con células de la cavidad peritoneal. Para ello, 10^6 PEC (por condición) fueron incubadas con cTXNPxAtto647 y cTXNPxC52SAtto647 (0,1, 1 y 10 μ M) durante 1 hora a 37°C o a 4°C. Luego del período de interacción, las células fueron lavadas y fijadas con formaldehído 2 % e incubadas con un anticuerpo anti F4/80 conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 20 min. Las muestras fueron analizadas en un Citómetro de Flujo (BD FACS Calibur) donde se evaluó la intensidad de fluorescencia media (MIF) de Atto67 en células F4/80 positivas (F4/80⁺).

13. CUANTIFICACIÓN DE LDL Y RECEPTOR DE LDL POR MICROSCOPIA

Para evaluar el efecto de cTXNPx en la incorporación de LDL se utilizó el *kit* “LDL Uptake Cell-Based Kit” (Cayman Chemical), este kit consiste en la LDL conjugada al fluoróforo DyLight™550 (λ ex 540 nm; λ em 570 nm), un anticuerpo que reconoce el receptor de LDL generado en conejo, un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a DyLight™488 generado en cabra, así como una solución de bloqueo y una de fijación. Para el ensayo de incorporación de LDL, las células HeLa fueron colocadas a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en placas de 12 pocillos que contenían cubreobjetos circulares. A las 24 h, fueron incubadas con cTXNPx 1 μ M diluida en DMEM con 10 % de SBF durante 6 h. Luego del tratamiento, la proteína fue removida y se agregó la LDL conjugada a DyLight550 por 30 min a 37°C en oscuridad. Luego de los lavados, las células fueron fijadas y se realizó la inmunodetección con el

anticuerpo anti receptor de LDL siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia confocal.

14. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES

Para evaluar la proliferación, las células HeLa fueron incubadas con 1 μ M de cTXNPx (considerando la forma monomérica) durante 2 h. A continuación se agregó 50 μ M de bromodeoxiuridina (BrDU) por 4 h adicionales. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4 % y se realizó el ensayo de IFI como se describió anteriormente, utilizando un anticuerpo anti BrDU diluido 1/50 y un anticuerpo secundario anti ratón conjugado a Alexa 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Icy [163]. Para el análisis de la incorporación de BrDU se capturaron imágenes con el microscopio de epifluorescencia y usando el software Icy se seleccionaron los núcleos celulares como regiones de interés (ROIs). A los distintos ROIs se les midió la intensidad de fluorescencia media (MIF) emitida a 488 nm y cada célula se graficó como un punto independiente. Como control positivo, las células fueron incubadas con medio conteniendo una concentración de SBF de 20 %.

15. ELISA

ELISA Sandwich

Para la determinación de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos se utilizó un ELISA *Sandwich*. Para ello, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pocillos con el anticuerpo de captura (anti IL6, IL12p40, IL10 de ratón o anti IL8 humano) (BD Biosciences-US) a la dilución recomendada en buffer carbonato 0,1 M pH 9 durante toda la noche a 4°C. Luego de dos lavados con PBS-Tween 0,1 % (PBST), los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1% durante 1 h a 37°C. Posteriormente fueron lavados dos veces con PBST e incubados con los sobrenadantes de cultivos (sin diluir o diluidos 1/2 en PBS BSA 0,1 %) así como con las citoquinas estándar correspondientes. Las muestras se incubaron a 37°C por 2 h y luego de 3 lavados con PBST, las placas fueron incubadas con el anticuerpo conjugado a biotina a la dilución adecuada y se incubaron durante 1 h a 37°C. Luego este período, las placas se lavaron 3 veces con la solución de lavado y se incubaron posteriormente con estreptavidina conjugada a peroxidasa a una dilución 1/1000 en PBS-BSA 0,1 % durante 45 min a 37°C. A continuación, las placas se lavaron 4 veces con la solución de lavado y se procedió al revelado utilizando o-fenilenediamina dihidrocloruro OPD (Sigma-Aldrich, USA) y H₂O₂ en buffer citrato-fosfato pH 5 como se indica en las instrucciones del

producto. La solución de revelado se incubó por 30 min a 37°C y la reacción se detuvo con el agregado de HCl 3 M. La lectura se desarrolló en un lector de placas a 492 nm.

ELISA Directo

Para la determinación de anticuerpos específicos anti cTXNPx en los sueros de los animales inmunizados con cTXNPx o en sueros humanos, se sensibilizó una placa de ELISA con 100 µL de cTXNPx (a una concentración de 5 µg/mL de proteína recombinante diluida en PBS) durante 16 h a 4°C. Las placas fueron lavadas con PBS Tween 0,1 % dos veces y bloqueadas con PBS-BSA 1 % durante 1 h a 37°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas e incubadas con diluciones seriadas de los sueros en PBS 0,1 % por 1 h a 37°C. Luego de 3 lavados, la placa se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Dako) diluido 1/5000 o con un anticuerpo anti-IgG humano conjugado a peroxidasa 1/2000 (Santa Cruz) con PBS 0,1% durante 1 h 37°C. Luego de este periodo, la placa se lavó 4 veces y se procedió al revelado utilizando OPD (Sigma-Aldrich, USA) y H₂O₂ en buffer citrato-fosfato pH 5 como se indica en las instrucciones del producto. La solución de revelado se incubó por 30 min a 37°C y la reacción se detuvo con el agregado de HCl 3 M. La lectura se desarrolló en un lector de placas a 492 nm

Obtención de sueros humanos de pacientes chagásicos

Las muestras de pacientes humanos chagásicos se obtuvieron en colaboración con la Dra. Karina Gómez del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET). La selección de pacientes y toma de muestras estuvo a cargo de médicos del Servicio de Cardiología del Hospital de Agudos Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina. Se tomaron como criterios de inclusión para los pacientes de edades entre 18 y 65 años, con 2 o más ensayos serológicos positivos para Enfermedad de Chagas (ELISA, IFI y HAI), con la forma asintomática (sin alteraciones del electrocardiograma y radiografía de tórax) o con diferente grado de compromiso cardiaco, clasificados según la Asociación de Cardiología de Nueva York. El protocolo sigue los principios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital. Los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

16. EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN fue realizada utilizando el protocolo de “TriReagent” (Sigma-Aldrich, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas con 500 µL o 1 mL de TriReagent y se dejaron reposar 5 min a T amb. Luego se realizó la separación de fases agregando

cloroformo (200 μ L por cada mL de TriReagent) y agitando vigorosamente en un *vortex* por 15 seg. La mezcla se dejó reposar por 10 min y se centrifugó a 13000 g por 15 min. Luego de la separación de fases, se colectó la fase acuosa superior la cual se precipitó posteriormente con isopropanol (0,5 mL por mL de TriReagent). Luego de centrifugar la mezcla a 12000 g por 10 min, se obtuvo un pellet con ARN, el cual fue lavado con Etanol 75% y resuspendido en agua libre de ARNasas y ADNasas (Thermo SCIENTIFIC). En algunos casos, el ARN fue purificado utilizando el kit de purificación de ARN (ZymoResearch) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue eluido de las columnas con 30 μ L de agua libre de nucleasas y cuantificado usando el equipo Nanodrop 2000.

17. SÍNTESIS DEL ADN COPIA Y PCR EN TIEMPO REAL

A partir de 1 μ g de ARN se sintetizó el ADN copia utilizando la enzima M-MLV-RT (Invitrogen). Brevemente, 1 μ g de ARN fue mezclado con 1 μ L de cebador oligodT a una concentración 100 μ M (Fermentas) y 1 μ L de dNTPs de concentración 10 mM (Invitrogen) y agua libre de RNAsa hasta completar los 12 μ L. La mezcla fue calentada a 65°C por 5 min y colocadas rápidamente en hielo. A continuación se agregó 5 μ L del Buffer de la enzima (Invitrogen), 2 μ L de DTT 0,1 M, 0,5 μ L del inhibidor de RNAsa “RNasin” (Promega) y 1 μ L de la enzima M-MLV RT (200U/L) (Invitrogen). La mezcla fue incubada a 37°C durante 50 min y posteriormente la enzima fue desnaturalizada mediante la incubación a 70°C por 15 min. El DNA copia fue diluido 1/30 o 1/40 para su posterior utilización en la reacción de PCR en tiempo real.

Las reacciones de PCR en tiempo real fueron realizadas mezclando 5 μ L de reactivo SYBR Green (KAPA) con 0,2 μ L de cebador sentido, 0,2 μ L de cebador antisentido, 2 μ L de cDNA diluido y agua suficiente para un volumen final de 10 μ L. Las reacciones fueron realizadas en tubos de 0,1 mL (Axygen) o en placas de 48 pocillos, y la reacción de amplificación se realizó en el equipo de PCR en tiempo real Rotor gene 6000 (Corbett Research) o en el sistema Eco de Illumina. Los niveles de expresión fueron normalizados contra un gen normalizador (GAPDH o actina) y calculados utilizando el método del $\Delta\Delta C_t$ [164]. Este método consiste en la comparación de la expresión de un gen en dos condiciones diferentes (tratado y control por ejemplo) mediante el valor del ciclo umbral o C_t . El valor de C_t de cada condición es expresado en relación a un gen control de referencia (GAPDH/Actina). El valor de $\Delta\Delta C_t$ se calcula de la siguiente manera: $[(C_t \text{ gen de interés} - C_t \text{ gen de referencia}) \text{ en condición A} - (C_t \text{ gen de interés} - C_t \text{ gen de referencia}) \text{ en condición B}]$. Por último, el cambio de expresión o FC es igual a $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

En la siguiente Tabla se muestran los cebadores utilizados en este trabajo para las reacciones de PCR en tiempo real.

Gen	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')	Especie
HERPUD	CCAGAGGACCAGAGGTTAATT	CTTCACATTGCACACCAGATG	Humano
Grp78	TTGCCGTTCAAGGTGGTT	AGTGAGAACCATGGCAGAAAT	Humano
GAPDH	TCGGAGTCAACGGATTG	CCTGGAAGATGGTGATGG	Humano
IL8	CACCGGAAGGAACCATCTCA	TGGCAAACTGCACCTTCACA	Humano
IL1A	TCACGGCTGCTGCATTACAT	GGGTATCTCAGGCATCTCCTTC	Humano
IL6	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC	TACATGTCTCCTTTCTCAGGGC	Humano
IL12p40	GGAAGCACGGCAGCAGAATA	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG	Raton
TNF	GCCCACGTCGTAGCAAACCAC	TCGGCTGACGGTGTGGGTGA	Raton
IL6	GTATGAACAACGATGATGCACTTG	ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGGA	Raton
iNOS	AAACCCCTTGTGCTGTTCTCA	AAGTGAAATCCGATGTGGCCT	Raton
Fizz	CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTTG	GGTCCCAGTGCATATGGATGAGACC	Raton
Arginasa	GCTCAGGTGAATCGGCCTTTT	TGGCTTGCGAGACGTAGAC	Raton
IL10	TTCCCAGTCGGCCAGAGCCA	GGGGAGAAATCGATGACAGCGCC	Raton
IL1b	CCACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	Raton
IL8	AAGACCCTGCCAGTTGA	TCAGTTAGCCTTTTGTGTT	Raton
ACTINA	TGCGTGACATCAAAGAGAAG	GATGCCACAGGATTCCATA	Raton

18. MICROARREGLOS DE ADN

Los experimentos de microarreglos de expresión fueron realizados utilizando un diseño de un color y un chip humano de 4 X 44K “Genome Oligo Microarray” (G4112F, Agilent). A partir de ARN total, se tomó una alícuota de 200 ng la cual fue reversamente transcripta a ADNc, luego transcripta a ARNc y marcada utilizando el *kit* de un color “Low Input Quick Amp Labeling Kit, One color” (Agilent Technologies). El ARNc marcado fue purificado con columnas “Illustra RNA spin mini Isolation kit” (GE Healthcare, USA). La calidad y el rendimiento fueron calculados en las medidas del espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). Luego se procedió a la hibridización, lavados, ensamblados de los *chips* y escaneo de acuerdo al protocolo especificado por Agilent. Las láminas con los microarreglos fueron escaneadas usando un escáner de microarreglos de Agilent G2565BA. Las muestras marcadas fueron colocadas en los *chips* de hibridización por 17 h a 60°C a una rotación de 10 rpm. Se realizaron incubaciones sucesivas con diferentes soluciones de lavado, estabilización y secado de acuerdo con el protocolo de “Low Input Quick Amp Labeling kit”. Se utilizó el programa Agilent Feature Extraction (version 9.5.1) para el control de calidad, filtrado de datos y normalización así como para la conversión de imágenes en datos cuantitativos para los análisis posteriores. Se realizaron tres réplicas biológicas de cada condición y cada experimento fue estadísticamente comparado utilizando el programa Genespring 12.0Gx. Los genes diferencialmente

expresados fueron identificados con el test ANOVA con un valor de p de 0,05 y una corrección Benjamini–Hochberg para testeados múltiples

19. CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS, SECUENCIADO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE RNASEQ DE CÉLULAS HUMANAS

Para los estudios de secuenciado masivo se utilizaron muestras de ARN de células HeLa control o tratadas con cTXNPx durante 6 horas, utilizando dos replicas biológicas de cada condición. Las librerías se prepararon utilizando el *kit* “ScriptSeq v2RNA-Seq library” (Epicentre). Las librerías fueron cuantificadas con el *kit* comercial “Qubit dsDNA HS Assay kit” (Invitrogen) y la distribución de tamaños de la librería fue evaluada con el “Agilent high-sensitivity DNA kit” (Agilent,) usando el 2100 Bioanalyzer (Agilent). La secuenciación fue de lectura simple (*single read*) de 72 ciclos, llevada a cabo con el secuenciador GAIIX (Illumina) en el Institut Pasteur de Montevideo. Las librerías y el secuenciado fueron realizados por la Mag. Gabriela Libisch y por el Dr. Gonzalo Greif de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

El análisis de los datos fue realizado por la Lic. Florencia Díaz Viraqué de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo como se describe a continuación.

En primer lugar se realizó el recortado de los *reads* eliminándose las N al final de la secuencia así como las secuencias adaptadoras para luego realizar el filtrado por calidad. Todos los análisis estadísticos para la detección de genes diferencialmente expresados se implementaron en R [165]. El alineamiento de los *reads* con el ensamblado de referencia del genoma humano GRCh38 y la generación de la Tabla de conteos se realizó empleando el paquete Rsubread [166]. El análisis de expresión diferencial se realizó con el paquete edgeR [167]. Se inspeccionaron las relaciones entre las muestras usando un análisis de reducción multidimensional (MDS plot). Los genes con menos de un conteo por millón (CPM = 1) en al menos dos de las muestras fueron descartados. Se ajustó un modelo factorial simple con un factor (control y tratado) mediante la implementación del “exact test” para una distribución binomial negativa. Se consideraron diferencialmente expresados aquellos genes con un *false Discovery rate* (FDR) menor a 0,05 y un *fold change* (FC) mayor a 2.

20. CONSTRUCCIÓN DE LIBRERÍAS, SECUENCIADO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS DE RNASEQ DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

A partir de ARN purificado de los tres estadios se construyeron dos librerías de lecturas de 36 y 72 pb para epimastigotas (E3 y E7), tripomastigotas (T3 y T7) y amastigotas (A3 y A7), las cuales fueron cuantificadas usando el *kit* “Kappa Library Quantification” (Kappa, Biosystems) y Qubit (Invitrogen). El control de calidad y el largo de la librería fue evaluado con el *kit* “DNA 100, Bioanalyzer”. Finalmente, 15 pM de las librerías (largo promedio 350 nt) fueron clusterizadas en un Illumina Single Read Flow Cell in cBot (Illumina). Se realizaron secuenciados simples de 36 o 72 nt ciclos en un secuenciador GAIIx con los *kits* de secuenciado Illumina Sequencing (TruSeq SBS v5-GA kit, Illumina).

Se generaron dos librerías de 36 y 7 nucleótidos cada una para cada estadio. Los *reads* fueron filtrados por ARN ribosomal y un valor mínimo de q de 20. Las lecturas obtenidas o *reads* de buena calidad fueron alineados contra el genoma de referencia Dm28c usando Bowtie [168] permitiendo dos o tres *missmatch* para los *reads* de 36 y 72 nt respectivamente y posteriormente se cuantificaron los niveles de los transcriptos en los diferentes estadios usando ERANGE (Enhanced Read Analysis of Gene Expression) [169]. Los estudios de expresión diferencial fueron realizados el paquete de R DESeq2 [170], los genes diferencialmente expresados fueron definidos como genes con al menos un cambio mayor de 2 veces en sus niveles de expresión con un FDR menor a 0,05. El análisis bioinformático de los resultados fue realizado por la Dra. Luisa Berna de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo.

21. ENSAYOS IN VIVO

Para la evaluación del efecto *in vivo* de cTXNPX, se utilizaron ratones hembra BALB/c de 9 semanas los cuales fueron separados en cuatro grupos experimentales. Los distintos grupos fueron inyectados intraperitonealmente con 10 µg de antígeno 6 veces los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Los experimentos fueron realizados en la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina, por la Dra. Teresa Freire la cual está acreditada por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) para trabajar con animales de experimentación siguiendo los protocolos aprobados actuales.

Los grupos fueron inmunizados con cTXNPx (grupo 1), cTXNPxC52S (grupo2), Mock (grupo 3) y PBS (grupo 4). Al día 13 los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para la extracción de sangre, colección de PEC y esplenocitos del bazo.

La sangre se dejó 1 h a 4°C y luego fue centrifugada para separar el plasma el cual fue utilizado para la titulación de anticuerpos. La obtención de las PEC y el enriquecimiento en macrófagos fue descrita previamente en materiales y métodos (B.1). A partir del bazo se obtuvieron los esplenocitos por disrupción

del tejido en medio RPMI y estos fueron sembrados en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^6 células por pocillo y estimulados con las proteínas recombinantes por 72 h para evaluar la producción de citoquinas por ELISA.

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La evaluación estadística fue realizada utilizando el t-test de Student para datos no pareados. Los resultados fueron considerados significativos si el valor de p era menor o igual a 0,05. Los datos se expresaron en las gráficas como $\pm$ SEM.

G. RESULTADOS

Organizamos los resultados de esta tesis en tres capítulos. En el primer capítulo nos enfocamos en el estudio de la respuesta de las células humanas a la infección temprana por *T. cruzi* principalmente mediante el análisis transcriptómico global de las células infectadas, con el objetivo de conocer las vías alteradas tempranamente en la infección (objetivos 1 y 2 de la tesis). Una parte de estos resultados fueron ya publicados en el artículo “Early *Trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells” [171]. En el segundo capítulo de este trabajo nos centramos en los cambios globales a nivel del transcriptoma de *T. cruzi* durante sus transiciones asociadas al pasaje entre los distintos hospederos (Objetivos 3 y 4 de la tesis). Parte de los resultados del segundo capítulo se incluyeron en un trabajo que está actualmente en revisión en la revista PeerJ titulado “Transcriptomic analysis reveals that metabolic switch and surface remodeling are key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*”. Por último, el tercer capítulo está enfocado en el estudio de rol que cumple en la comunicación intercelular entre el parásito y la célula hospedera la triparredoxina peroxidasa de *T. cruzi* la cual se secreta al exterior celular (objetivos 5, 6 y 7) cuyo manuscrito está en preparación.

1. RESPUESTA CELULAR TEMPRANA A LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI

Como primer objetivos nos planteamos el estudio a nivel transcripcional de la respuesta temprana de células epiteliales a la infección por *Trypanosoma cruzi*, usando la línea HeLa. Este modelo ha sido ya utilizado para estudiar el proceso de invasión por *T. cruzi* [172-175]. Para ello, nos planteamos el estudio de la respuesta inicial o temprana a la infección, considerando temprana a los tiempos 0, 3 y 6 horas post interacción (t_0 , t_3 y t_6). Durante este período se produce la adhesión, entrada y egreso del parásito de la vacuola parasitófora, pero aún sin comenzar con la replicación intracelular del parásito [176]. El estudio de la respuesta temprana de células epiteliales a la infección por *T. cruzi* se enmarca en la línea de investigación del grupo donde estudiamos la respuesta a la infección en distintos modelos celulares humanos, entre ellos macrófagos, cardiomiocitos y células madre utilizando condiciones experimentales similares de manera de obtener resultados comparables (resultados del laboratorio no publicados).

Para el análisis de los genes diferencialmente expresados utilizamos el programa Genespring® considerando genes con cambios de expresión mayor o igual a 2 ($FC \geq 2$) y con una probabilidad del 95% de estar diferencialmente expresados corregido por Benjamini-Hochberg ($p \leq 0,05$). En estas condiciones y en contraste a lo publicado previamente [149], encontramos más de 1000 genes sobreexpresados y cerca de 400 genes subexpresados durante la infección temprana, siendo t_3 el tiempo con el mayor número de genes diferencialmente expresados (Figura 8).

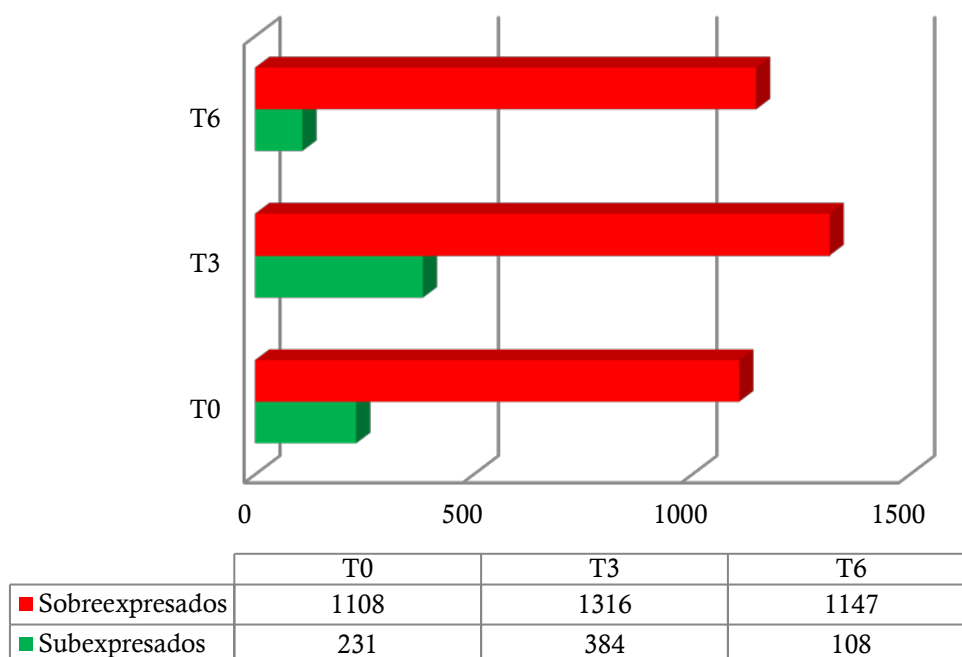


Figura 8: Genes diferencialmente expresados en células HeLa infectadas con *T. cruzi* a los distintos tiempos (t_0 , t_3 y t_6) en comparación con células control. En rojo se muestran los genes sobreexpresados y en verde los subexpresados, mientras que la Tabla muestra el número de genes diferencialmente expresados en cada condición.

Como se muestra en la Figura 9, el análisis de las características de los genes diferencialmente expresados a los distintos tiempos mediante diagramas de Venn, reveló que la gran mayoría de los genes sobreexpresados a t_0 (946 genes) permanecen sobreexpresados durante todo el ensayo. Por el contrario, tan solo 28 genes subexpresados son compartidos por los tres tiempos analizados. La Figura 9C resume la cantidad de genes que cambian su expresión específicamente en cada tiempo, es decir están diferencialmente expresados en una condición en comparación con el tiempo anterior.

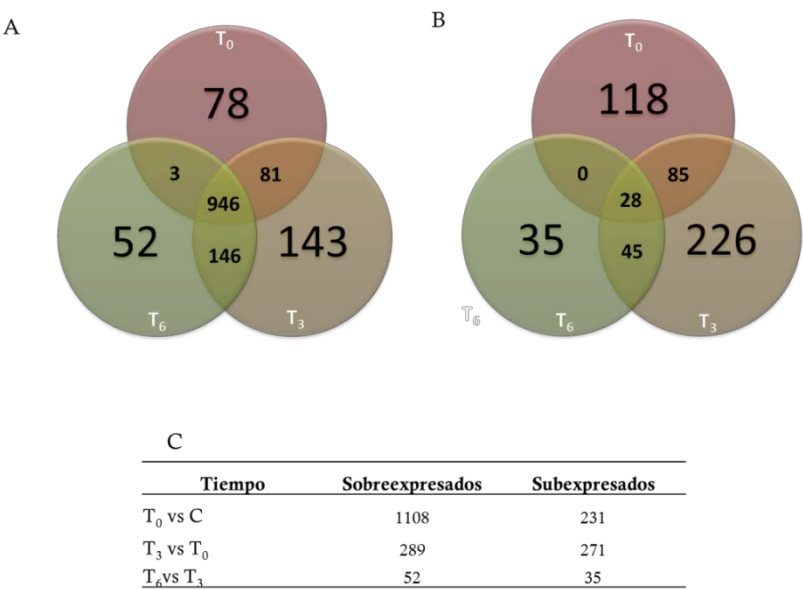


Figura 9: Diagrama de Venn mostrando los genes sobreexpresados (A) y subexpresados (B) en células HeLa infectadas con *T. cruzi* a los distintos tiempos (t_0 , t_3 y t_6). (C) Número de genes sobre o subexpresados comparando una condición con la anterior (t_0 vs C, t_3 vs t_0 y t_6 vs t_3)

Podemos observar entonces, que la interacción del parásito con las células epiteliales induce una rápida reprogramación de la expresión génica en el hospedero, donde la mayoría de los genes que se inducen permanecen sobreexpresados durante las primeras seis horas.

Análisis de vías y ontología génica

Para poder estudiar los procesos biológicos que se encuentran alterados en las células infectadas, realizamos análisis de ontología génica de dos maneras diferentes; en la primera, utilizamos los genes sobreexpresados a t_0 , t_3 y t_6 en comparación con el control, mientras que en la segunda sólo analizamos genes sobreexpresados en una condición en comparación con el tiempo anterior (Figura 9C) (t_0 contra control, t_3 contra t_0 y t_6 contra t_3) reflejando de alguna manera cambios específicos de cada tiempo (Figura 10).

Del primer análisis surge que los principales procesos alterados en las células infectadas son los relacionados con respuesta inmune, proliferación y diferenciación, metabolismo, vías de transducción de señales y respuesta a estrés (Fig. 10). Como se ve en la Figura 10A, el perfil de los procesos alterados es muy similar en los tres tiempos estudiados y esto es reflejo de que la mayoría de los genes son comunes a los tres tiempos analizados. Del segundo enfoque surgió que a t_0 existe una gran respuesta vinculada con la inmunidad, también con vías de proliferación/diferenciación, metabolismo, vías de transducción de señales y respuesta a estrés, mostrando un patrón similar al encontrado en la Figura 10A. Por otro lado, a

t_3 observamos que no hay genes enriquecidos relacionados con respuesta inmune (a diferencia de t_0) pero si una gran contribución de vías relacionadas con el metabolismo celular (metabolismo lipídico y de folato) y la transducción de señales. Por último, al evaluar los procesos específicos de t_6 encontramos nuevamente vías vinculadas a respuesta inmune y transducción de señales (principalmente receptores acoplados a proteína G) como los más relevantes, mientras que no existen genes sobreexpresados específicamente a este tiempo vinculados al metabolismo.

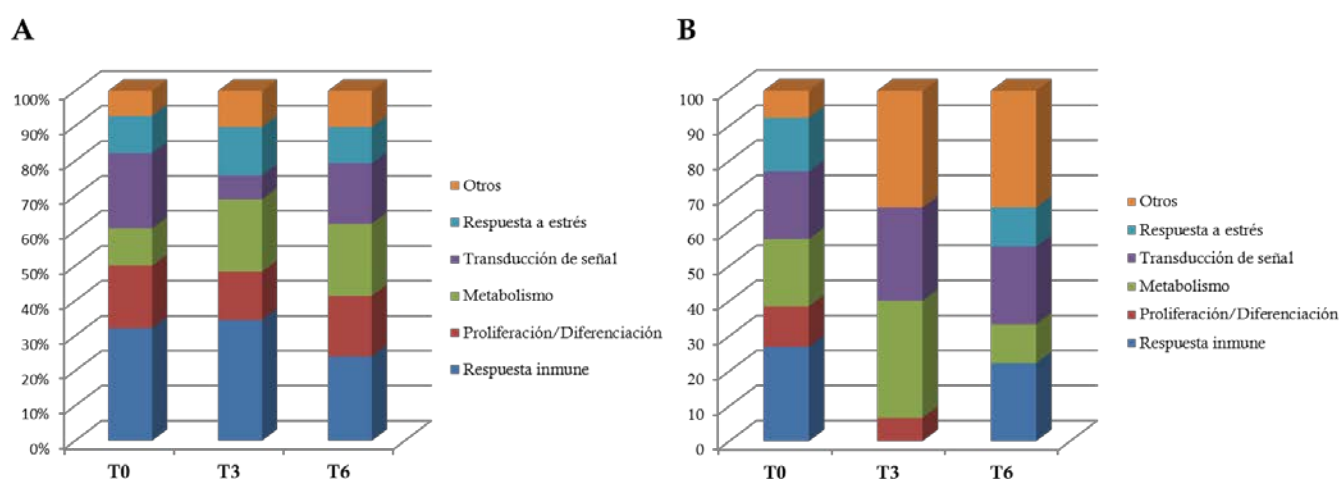


Figura 10: (A) Gráfico que muestra los principales procesos alterados durante la infección a t_0 , t_3 y t_6 en comparación con el control (B) Principales procesos alterados predichos en cada tiempo específico (t_0 vs C, t_3 vs t_0 y t_6 vs t_3)

Estos resultados sugieren que en cada tiempo ocurren procesos específicos, que coexisten con una gran perturbación de las vías relacionadas con la respuesta a estrés, respuesta inmune y proliferación, comunes a toda la infección temprana. Es importante resaltar, que las vías biológicas relacionadas con respuesta inmune enriquecidas a t_0 y t_6 no son exactamente las mismas; en t_0 predominan vías relacionadas con señalización a través de receptores TLR) y receptor de linfocitos T (TCR) así como también señalización mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF α), activación canónica y alternativa del factor nuclear NF- κ B, y también señalización vía interferón gama (IFN γ). Por el contrario, a tiempo t_6 , las vías de respuesta inmune están relacionadas principalmente con la señalización mediada por interferón alfa/ beta (IFN α/β). Dentro de la respuesta a estrés (comunes a todos los tiempos), las más representadas están vinculadas a estrés oxidativo, respuesta al daño en el ADN, modulación de la apoptosis y activación de Keap-Nrf2 que participa en la respuesta celular frente al daño oxidativo o por xenobióticos [177].

Respuesta inflamatoria e inducción de factores quimiotácticos durante la infección

Como ha sido observado previamente en distintos modelos celulares [32, 149, 153, 178, 179], la infección de células de mamífero por *T. cruzi* genera un fuerte impacto en la expresión génica del hospedero, cuya mayor contribución es debida a respuestas de tipo inflamatorias, proliferativas y de respuesta a estrés. En nuestro modelo de células epiteliales y durante la infección temprana encontramos que más del 50% de las vías afectadas también están relacionadas con estos procesos, principalmente a t_0 . La importante contribución de la respuesta tipo proinflamatoria también se evidencia al analizar los genes que muestran una sobreexpresión mayor o igual a 10 veces con respecto a la condición control (Tabla 1).

Tabla 1: Tabla con los genes que presentan un cambio de expresión mayor o igual a 10 en alguno de los tiempos estudiados

Gen	Descripción	FC, T_0	FC, T_3	FC, T_6
Respuesta inmune				
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	85,2	93,3	14,5
CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	39,9	23,1	3,1
CD96	CD96 molecule	27,4	24,4	24,2
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	20,0	18,9	7,6
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	49,8	12,3	6,2
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	64,9	12,7	4,1
EREG	epiregulin	9,2	13,8	4,1
IL1A	interleukin 1, alpha	18,0	6,3	2,3
IL6	interleukin 6	27,3	6,9	2,6
IL8	interleukin 8	326,9	67,9	16,6
OLR1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	16,2	24,9	14,7
PTX3	pentraxin 3, long	13,8	13,1	9,3
Inhibición apoptosis				
BCL2A1	BCL2-related protein A1	16,4	27,4	8,2
BIRC3	baculoviral IAP repeat containing 3	23,6	7,2	2,8
Transcripción				
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	11,6	12,4	4,6
MYCL1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1	2,2	5,5	10,7
RELB	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	11,0	9,3	5,0
Señalización				
RGR	retinal G protein coupled receptor	20,7	24,1	20,4
PRKG1	Human mRNA for type I beta cGMP-dependent protein kinase	22,2	27,7	24,0
Adhesión				
MUC4	mucin 4, cell surface associated	1,9	10,7	4,5
SDC4	syndecan 4	11,4	7,7	2,5
STATH	statherin	10,7	13,2	10,9
Transporte				
SLC9A6	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6	12,7	13,7	11,3
Lípidos				
ELOVL7	ELOVL fatty acid elongase 7	10,8	10,3	5,1
Respuesta estrés				
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	15,2	3,3	3,2
Otros				
TCL6	T-cell leukemia/lymphoma 6 (non-protein coding)	28,4	28,3	26,1
TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3	19,4	28,9	10,6
WFC10A	WAP four-disulfide core domain 10A	3,2	10,0	10,1
NCRNA00246A	non-protein coding RNA 246A	10,0	11,9	11,3
LOC283174	hypothetical LOC283174	44,3	39,9	40,4
FLJ44715	cDNA FLJ44715 fis	18,8	21,0	19,6
A1BG	cDNA FLJ31639 fis	29,1	39,1	30,8
ART3	ADP-ribosyltransferase 3	2,2	5,8	12,5

Como se puede ver en la Tabla 1, existe una importante inducción de genes que actúan como mediadores proinflamatorios y particularmente, varios genes que codifican quimioquinas inducidos en tiempos muy tempranos de la infección (*CCL2*, 3, 5, 8 y 23, *CXCL1*, 2, 3 y 8). Algunas de las quimioquinas actúan como factores quimiotácticos para neutrófilos, este es el ejemplo de los genes *CXCL1* y *CXCL8* o *IL8*.

En este trabajo nos enfocamos en la interleuquina 8 (IL8) ya que este gen mostró la mayor inducción (300 veces) luego del contacto con el parásito y juega un rol en la quimiotaxis de neutrófilos, basófilos y células T además de tener una fuerte actividad proangiogénica [180]. Además de observar la fuerte inducción de IL8 a nivel transcripcional, también demostramos la secreción de esta quimioquina al medio de cultivo durante la infección a t_0 , t_3 y t_6 como se ve en la Figura 11.

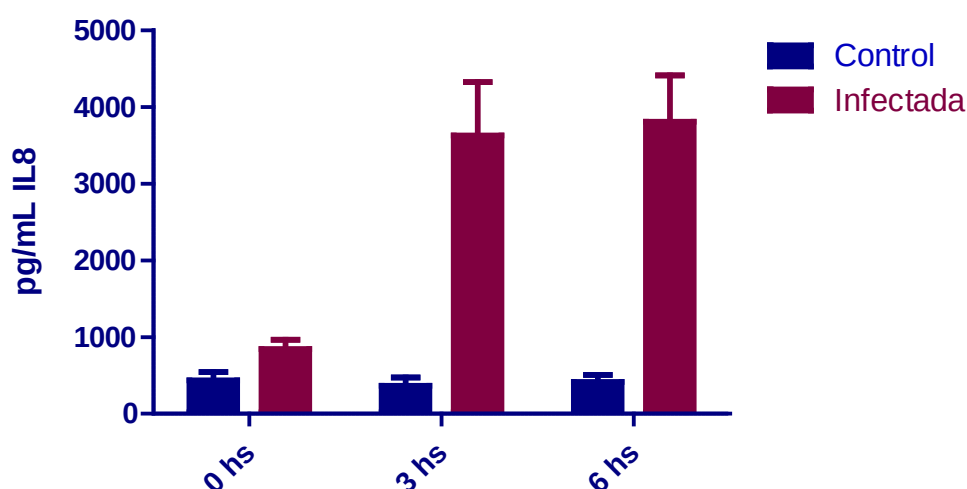


Figura 11: Secreción de IL8 en sobrenadantes de células HeLa infectadas con tripomastigotas a t_0 , t_3 y t_6 en comparación con controles no infectados. La detección fue realizada por ELISA.

La expresión de IL8 en las células está principalmente controlada por tres factores de transcripción: NF- κ B, NF-IL6 y AP-1 (Figura 12A) [1]. Para poder evaluar la contribución de cada uno de ellos en la expresión de IL8 inducida por la infección, realizamos un ensayo de gen reportero con la región promotora de IL8 fusionada al gen que codifica para la enzima luciferasa. Adicionalmente se estudió el efecto de mutaciones en los sitios de unión para los distintos factores de transcripción (NF- κ B, NF-IL6 y AP-1) como se muestra en la Figura 12. Luego de la infección de las distintas líneas reporteras, se

midio la actividad luciferasa (la cual fue normalizada según los niveles de transfección utilizando la actividad β galactosidasa) por mg de extracto, como fue reportado previamente [1].

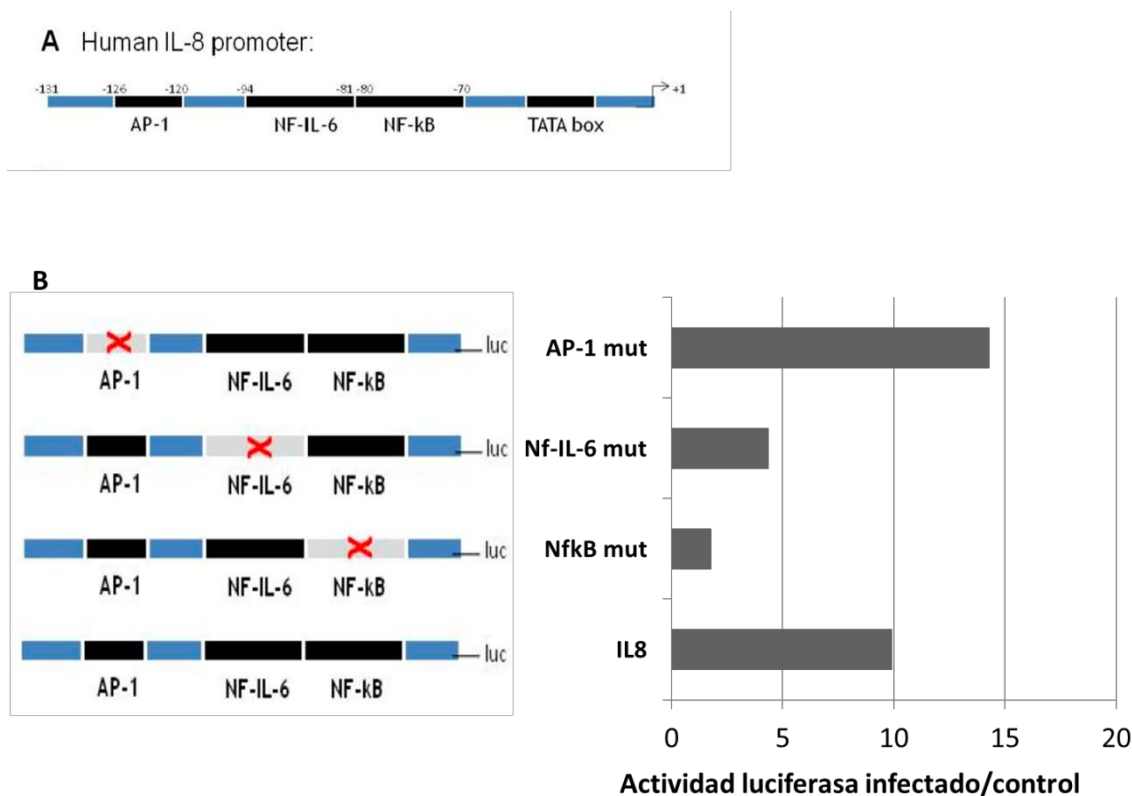


Figura 12: Esquema de la región promotora del gen IL8 (A). En la Figura B se representa el cambio en la inducción de la actividad luciferasa de células infectadas en relación al control para las células transfectadas con distintas construcciones (promotor salvaje, mutante para el sitio de unión de AP-1, NF- κ B y NF-IL6). La actividad luciferasa fue normalizada con la actividad β galactosidasa como control de la eficiencia de la transfección y con los mg totales de proteína de cada extracto. Figura modificada de [1].

Los resultados obtenidos sugieren que la inducción de IL8 esta mediada principalmente por el factor de transcripción NF- κ B, aunque también existe una contribución de NF-IL6. La relevancia de NF- κ B en la respuesta a la infección (así como también en la inducción de IL8) quedó evidenciada por la inducción de varios genes pertenecientes a la familia NF- κ B en las células epiteliales infectadas (Figura 13), así como también a la inducción de genes que son controlados por este factor de transcripción (anexo 1).

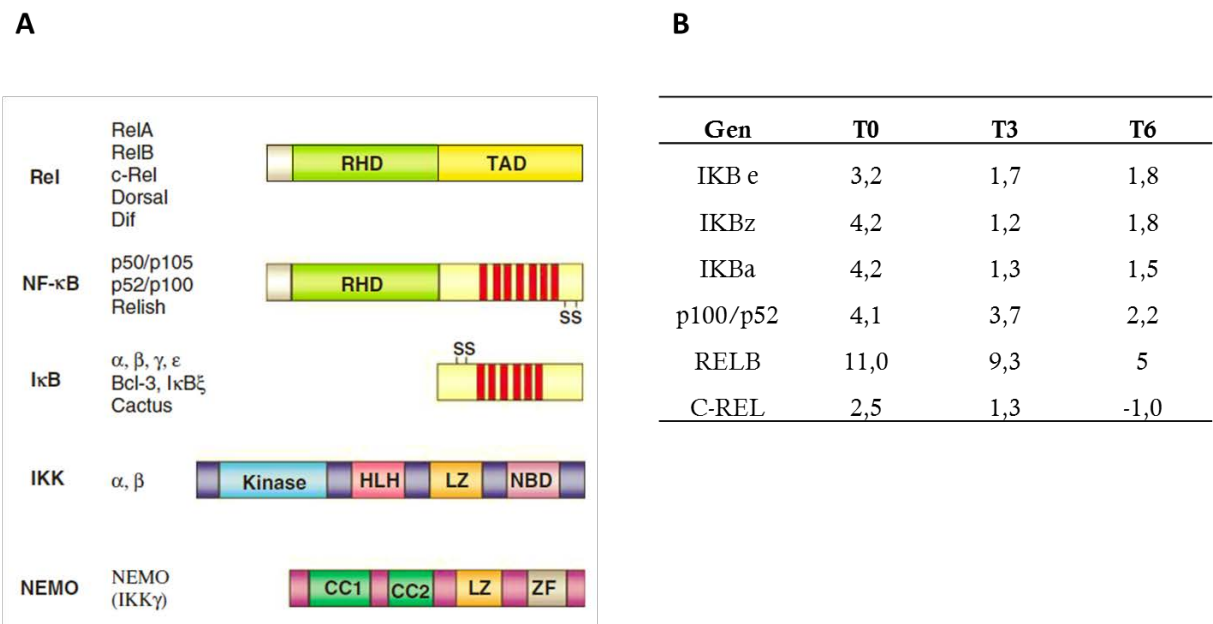


Figura 13: (A) Esquema representando los distintos miembros de la familia NF-κB y sus dominios principales. Extraído de [4]. (B) Tabla mostrando los genes de la familia NF-κB diferencialmente expresados y su cambio de expresión a t_0 , t_3 y t_6 .

Los dímeros activos de NF- κB se forman por asociación de miembros de la familia NF- κB con miembros de REL formando hetero u homodímeros, siendo el más frecuente p50/RelA formado por la activación de la vía clásica o canónica de NF- κB [4]. Por otro lado la activación no canónica lleva a la formación de dímeros Rel B/p52. Al analizar los genes de la familia NF- κB inducidos durante la infección (Figura 13B) vemos que tanto el gen Rel B como p52 son los que mostraron una mayor inducción, sugiriendo que hay activación de la vía no canónica de NF- κB. A pesar de ello, en un ensayo preliminar también logramos evidenciar la activación de la vía canónica de NF-κB durante la infección, analizando la translocación de la subunidad p65 al núcleo de las células infectadas mediante inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 14, la translocación de NF-κB al núcleo ocurre rápidamente luego de 10 minutos de interacción del parásito con las células HeLa.

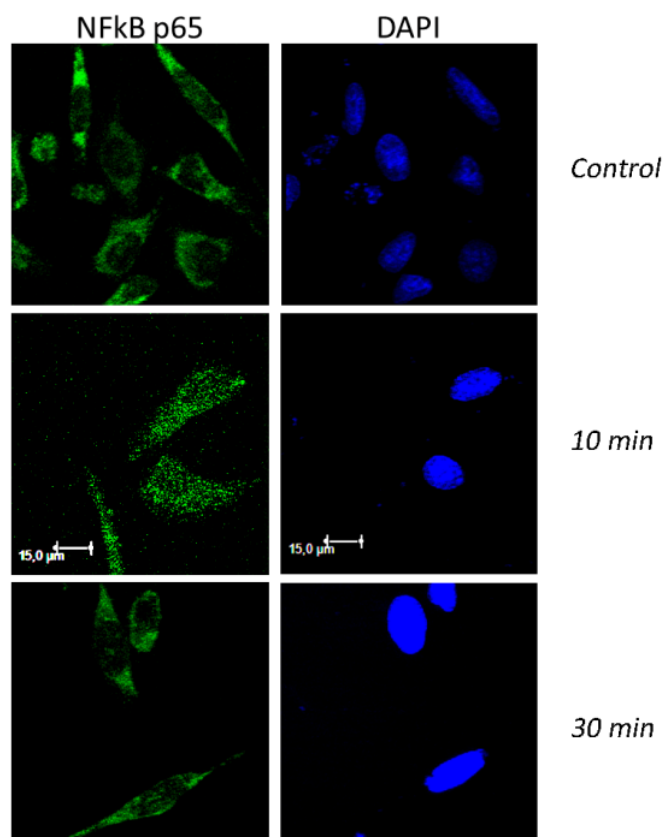
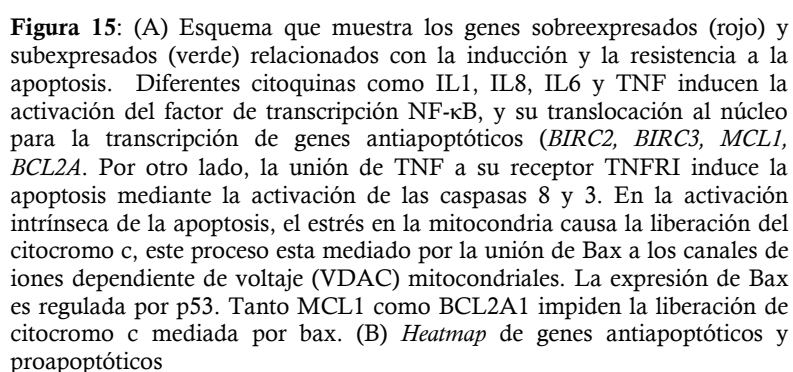


Figura 14: Inmunofluorescencia con anticuerpo anti p65 en células control o infectadas con tripomastigotas durante 10 o 30 minutos. Los núcleos fueron visualizados con DAPI

Estos resultados sugieren que la infección temprana de células epiteliales induce la expresión de genes que codifican para citoquinas del tipo proinflamatorio y en particular IL8. Demostramos que la inducción de IL8 en este modelo es dependiente principalmente del factor de transcripción NF- κ B, el cual también participa en la reprogramación de las células epiteliales.

Además de su rol en la inducción de citoquinas inflamatorias, NF- κ B ha sido involucrado en procesos tales como la proliferación y la apoptosis. Parte de estos procesos se encuentran mediados por la citoquina TNF α , cuyo gen también se encuentra inducido en las células HeLa infectadas con *T. cruzi*. Hemos analizado también los genes diferencialmente expresados que participan en la modulación de la apoptosis, los resultados fueron esquematizados en la Figura 15.



Como se ve en la Figura 15, nuestros resultados indican que durante la infección se produce una fuerte modulación de la apoptosis, donde encontramos una inducción de genes que participan en la resistencia frente a la muerte celular programada. Los genes *BIRC2* y *BIRC3* que participan directamente en la inhibición de la apoptosis inducida por TNF α [181], se encuentran sobreexpresados durante el ensayo. Por otro lado, durante la activación de la vía intrínseca de la apoptosis, se produce la liberación de Citocromo c desde la mitocondria al citosol mediada por proteínas pro apoptóticas como Bax y Bak [182]. Esta liberación es impedida por la unión de proteínas anti apoptóticas de la familia BCL2 como MCL1, BCL2 y BCL2A1. Nuestros resultados mostraron una sobreexpresión de los genes que codifican estas proteínas durante la infección. Otro de los genes antiapoptóticos sobreexpresados durante la infección es el que codifica para la superóxido dismutasa 2 (*SOD2*). Esta enzima está involucrada en la protección de la mitocondria frente al daño oxidativo, proceso altamente relacionado con la apoptosis [183]. El esquema de la Figura 15 refleja la complejidad del balance entre señales de muerte y de supervivencia celular. Nuestros resultados sugieren que la infección en células epiteliales induce una resistencia a la apoptosis así como también la promoción de la proliferación celular.

De hecho, encontramos una gran variedad de genes que codifican factores de crecimiento sobreexpresados durante la infección, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Genes sobreexpresados que codifican factores de crecimiento y su cambio de expresión a t_0 , t_3 y t_6

Gen	Nombre	FC T_0	FC T_3	FC T_6
CTGF	connective tissue growth factor	1.6	3.3	3.1
FGF16	fibroblast Growth factor 16	2.7	3.4	3.0
FGF17	fibroblast Growth factor 17	2.7	5.4	4.5
FGF18	fibroblast Growth factor 18	2.5	1.9	2.6
FGF5	fibroblast Growth factor 5	2.3	3.1	2.3
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1	2.4	3.3	2.4
GHR	growth hormone receptor	4.0	5.3	4.9
HGF	hepatocyte growth factor	2.3	3.1	2.3
IGF2BP2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	2.4	3.3	2.4
NRG1	neuregulin 1	2.1	4.8	3.3
PGF	placental growth factor	4.1	2.4	2.8
TGFA	transforming growth factor, alpha	2.4	3.3	2.8

Acorde con esta importante respuesta inmune, antiapoptótica y proliferativa, se encontró la inducción de muchos factores de transcripción los cuales parecen mediar este proceso, entre ellos varios miembros de la

familia NF- κ B (Figura 13) así como también *JUN*, *JUND*, *ATF2*, *FOSL1* y *FOSL2*. Estos factores forman hetero u homodímeros formando el factor de transcripción AP-1, que tiene un rol central en la regulación de la proliferación, diferenciación, inmunidad y respuesta a estrés [184]. Un hecho sorprendente, es que cerca del 15 % de los genes suprimidos durante la infección codifica para factores de transcripción, lo cual refleja también la reprogramación de la expresión génica que ocurre durante la infección.

Expresión de genes de respuesta al daño en el ADN en células infectadas por *Trypanosoma cruzi*

Otra de las vías en cuál nos enfocamos es en la respuesta al daño en el ADN (DNA Damage response o DDR del inglés) inducida por el parásito en las células infectadas, ya que es uno de los procesos más significativamente alterados durante la infección. El propósito de la DDR es reconocer y reparar el daño en el ADN y llevar a la célula hacia tres posibles destinos: la apoptosis, detención del ciclo celular y reparación o la senescencia dependiendo de la magnitud del daño y de la eficiencia de la reparación [185]. Para realizar el análisis de los genes relacionados a la DDR los agrupamos en aquellos relacionados a la reparación del daño en el ADN y en aquellos involucrados en el control del ciclo celular, el cambio de expresión de estos genes se muestra en la Figura 16.

Distintos genes que participan en el control del ciclo celular se encontraron diferencialmente expresados, entre ellos p15 (*CDKN2B*) y p21 (*CDKN1A*) que son inhibidores de quinasas dependientes de ciclina implicados en la inhibición de la proliferación celular bajo condiciones de estrés, se inducen en la infección. p21 contribuye al “checkpoint” del ciclo celular disparado por la respuesta al daño en el ADN, lo que sugeriría que *T. cruzi* dispara una detención del ciclo celular transitoria para la reparación del daño. (Figura 16).

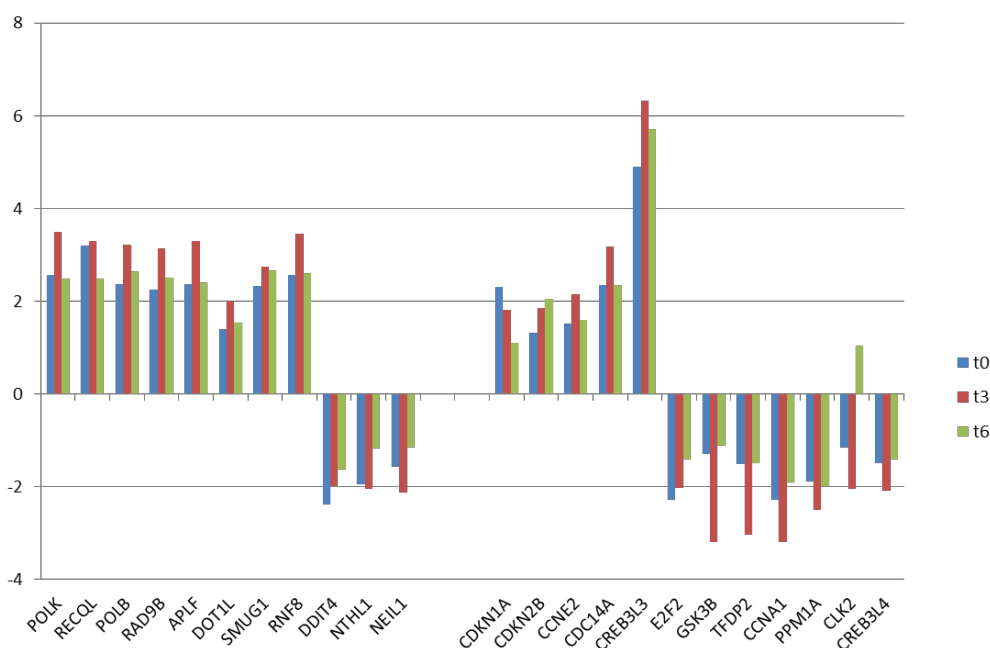


Figura 16: Gráfica que muestra el cambio de expresión (FC) de genes relacionados con la respuesta al daño en el ADN a t_0 , t_3 y t_6 . Los genes fueron agrupados según su función en reparación del ADN y en control del ciclo celular.

Con el objetivo de evidenciar el daño en el ADN inducido por la infección en células epiteliales, realizamos un ensayo de Western blot a partir de extractos de células control e infectadas e interrogamos con un anticuerpo que reconoce la variante de histona H2AX fosforilada. La aparición de histona H2AX fosforilada también la evaluamos por inmunofluorescencia observando resultados similares (resultados no mostrados). La histona H2AX es un marcador de daño en el ADN la cual se asocia principalmente en los cortes de doble hebra del ADN [186], y juega un rol fundamental en el reclutamiento de factores de reparación hacia los sitios de daño [187]. En la Figura 17 se observa la aparición de la variante de histona fosforilada en los primeros tiempos de la infección exclusivamente ya que a T_6 no se pudo detectar.

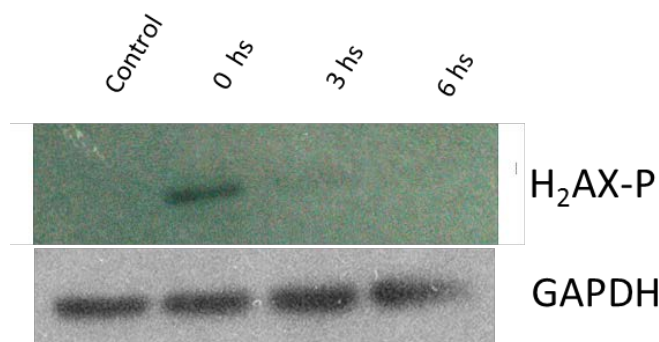


Figura 17: Western blot de extracto de células HeLa control o infectadas con *T. cruzi* a t_0 , t_3 y t_6 post interacción utilizando el anticuerpo anti H2AX fosforilada, los extractos proteicos fueron normalizados utilizando el anticuerpo anti GAPDH.

Nuestros resultados mostraron que la infección por *T. cruzi* induce un daño en el ADN, el cual es señalizado en la célula hospedera mediante la inducción de genes que participan en la reparación y en el control del ciclo celular

Relación entre la secreción de IL8 y la activación de la vía de respuesta al daño en el ADN

Se ha demostrado que la activación de la respuesta al daño en el ADN activada en el núcleo de las células frente a un estrés genotóxico es capaz de inducir la secreción de la IL8 mediada por NF- κ B y que esta inducción depende de la fosforilación de la proteína “NF- κ B essential modulator” (NEMO) por ataxia telangiectasia mutado (ATM) y de su transporte del núcleo al citoplasma [188]. También se ha demostrado la activación de NF- κ B inducida por estrés intracelular como por ejemplo choque térmico y estrés oxidativo, aún en ausencia de daño en el ADN [189]. Debido que demostramos la secreción de IL8, activación de NF- κ B así como la inducción de genes de la DDR en células infectadas, nos preguntamos si existía una relación entre ellos.

Para evaluar el posible rol de la quinasa ATM en la inducción de la expresión de IL8 tras la infección, utilizamos una línea de fibroblastos ATM $-/-$ en comparación con fibroblastos salvajes y medimos por ELISA la cantidad de IL8 secretada en células mutantes y salvajes infectadas con *T. cruzi*. En la Figura 18 se representa la relación de IL8 entre células infectadas y control no infectadas a las 3 y 6 horas de interacción con tripomastigotas. Los resultados sugieren que la inducción de IL8 no depende de la activación de ATM, ya que las células que no expresan la quinasa secretan niveles similares o incluso mayores de esta citoquina como consecuencia de la infección.

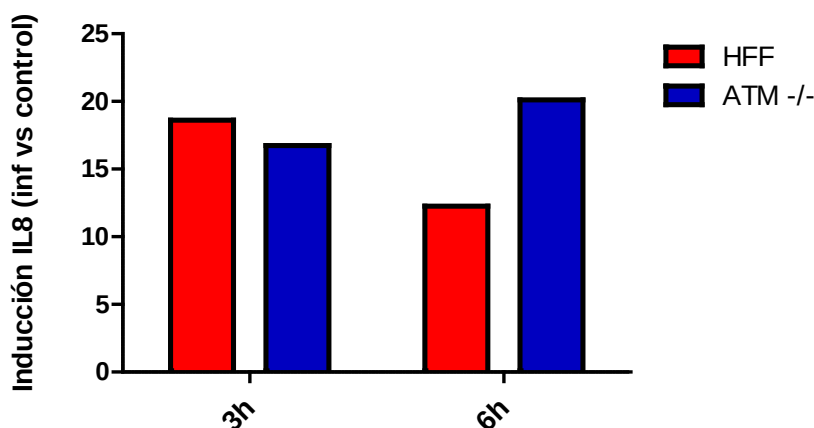


Figura 18: ELISA de Fibroblastos HFF o fibroblastos ATM $-/-$ infectados con *T. cruzi*. Los sobrenadantes de las células infectadas fueron colectados y analizados para evaluar la secreción de IL8. Los resultados se expresan como inducción de IL8 en células infectadas frente al control (sin infectar) a tiempo 3 y 6 horas de interacción.

Alteración de genes relacionados al metabolismo lipídico en células infectadas por *Trypanosoma cruzi*

En este trabajo encontramos también que varios genes relacionados con el metabolismo lipídico se expresaron diferencialmente como consecuencia de la infección temprana. Estos genes codifican proteínas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos, ácidos grasos y colesterol (Figura 19).

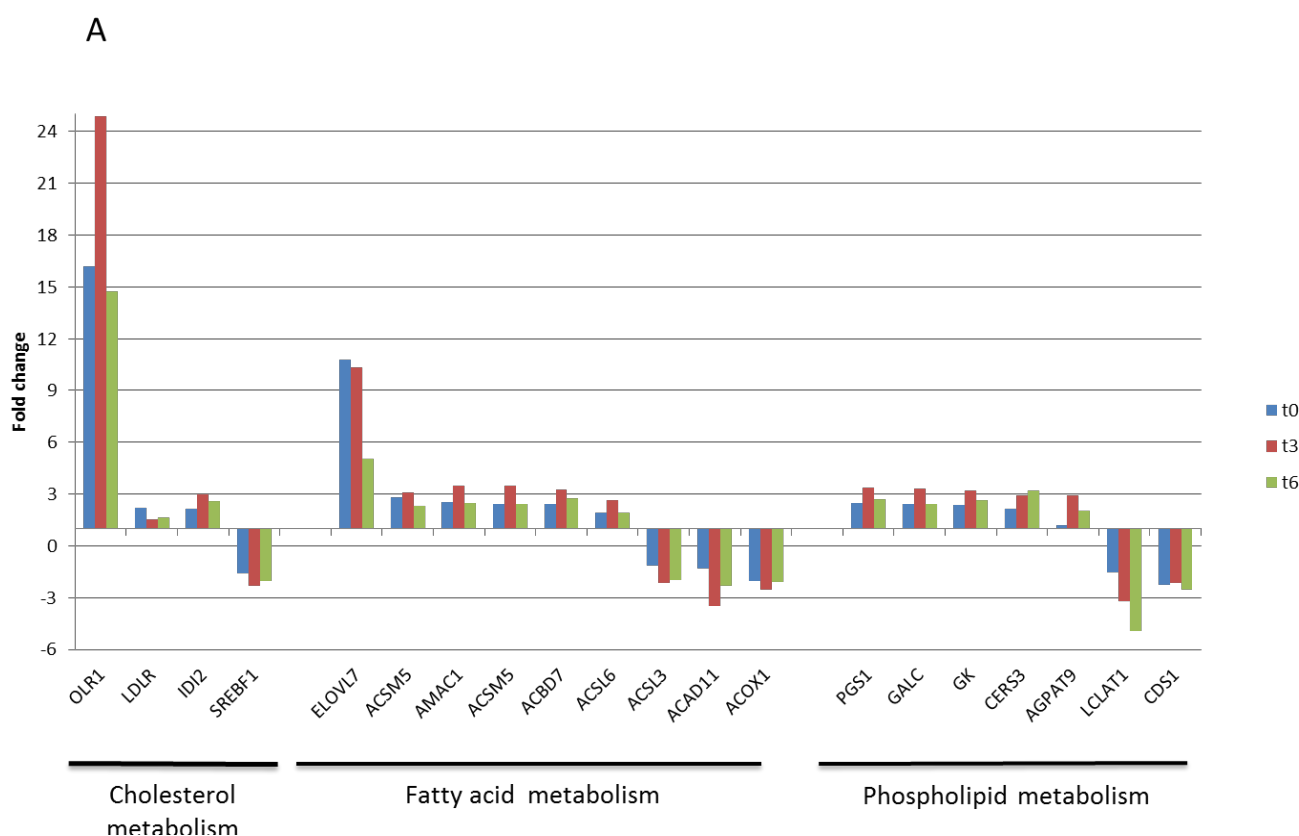


Figura 19: Análisis temporal de la expresión de genes relacionados con metabolismo lipídico (metabolismo de colesterol, de ácidos grasos y de fosfolípidos) a t_0 , t_3 y t_6 .

Dentro de los genes involucrados en el metabolismo del colesterol encontramos 3 transportadores sobreexpresados desde el comienzo de la infección: el gen que codifica para el receptor de la lipoproteína de baja densidad LDLr (*LDLR*), el gen que codifica para el receptor de la lipoproteína de baja densidad oxidada (*OLR1*) y el transportador de la familia ABC, codificada por *ABCA1* que participa en el eflujo de colesterol desde las células. Debido a la relevancia del receptor OLR1 en patologías cardiovasculares e

inflamatorias como la aterosclerosis [190], decidimos explorar su inducción no solo a nivel de ARN mensajero sino también a nivel proteico mediante Western blot. Además de estudiar la expresión de OLR1, estudiamos también la de la enzima PTGS2 (ciclooxigenasa-2) la cual participa en la síntesis de prostaglandinas y ha sido relacionada con los cuerpos lipídicos (Figura 20A). Adicionalmente utilizamos el marcador fluorescente rojo Nilo el cual se une a los lípidos neutros para evaluar la formación de gotas lipídicas durante las primeras horas de infección (Figura 20B).

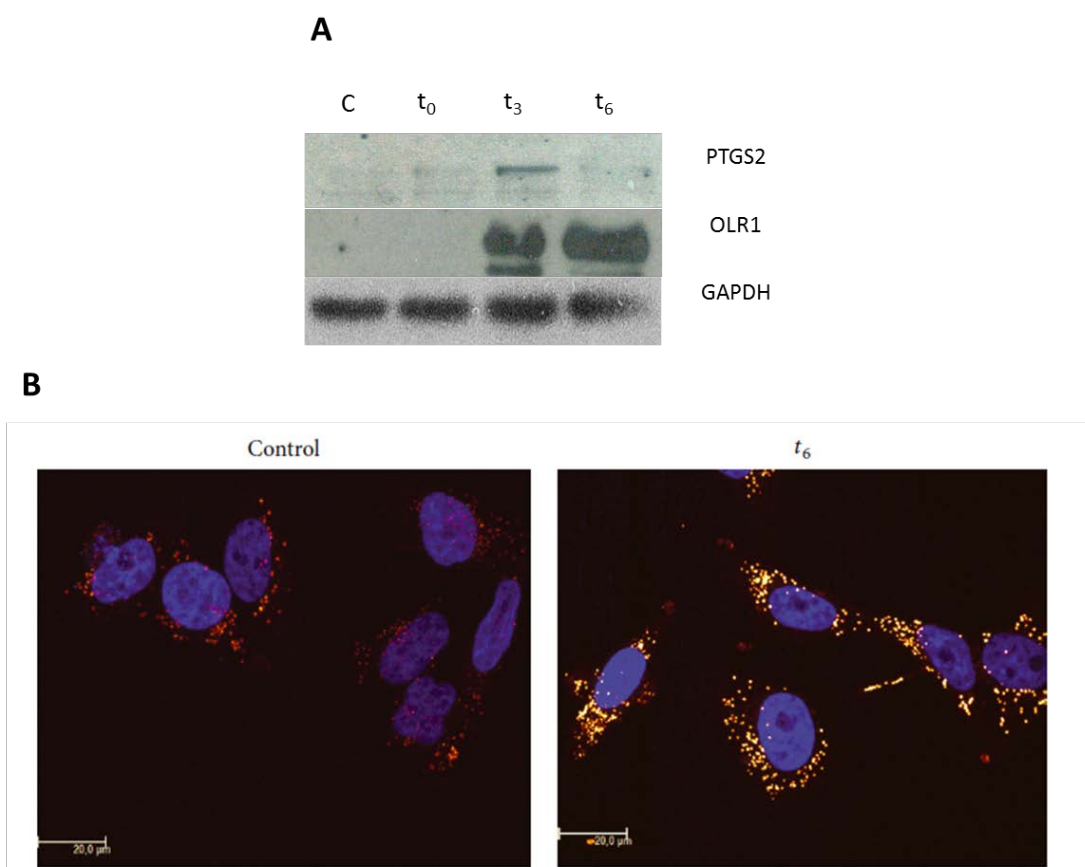


Figura 20: A) Evaluación de la expresión de ciclooxigenasa-2 (PTGS2) y el receptor de LDL oxidada (OLR-1) en células control e infectadas a T_0 , T_3 y T_6 . La expresión fue normalizada con GAPDH. B) Microscopía de fluorescencia de células control o infectadas a T_6 utilizando el marcador de lípidos neutros rojo Nilo. En azul se visualizan los núcleos teñidos con DAPI

Como se demuestra en la Figura 20, durante la infección temprana por *T. cruzi* se induce tanto la expresión de PTGS2 como de OLR1 a nivel de proteína a partir de t_3 . En concordancia con los resultados transcriptómicos y de Western blot, pudimos demostrar la acumulación de lípidos neutros luego de las 6

horas de infección, los cuales podrían tratarse de gotas o cuerpos lipídicos (LB), lo que podría implicar la localización de PTGS2 en los acúmulos lipídicos encontrados. Los LB contienen colesterol, se inducen en macrófagos durante la infección por *T. cruzi* y han mostrado ser sitios de producción activa de prostaglandinas [191].

Además del metabolismo del colesterol alterado, encontramos genes vinculados al transporte y activación de ácidos grasos, y más en particular a la síntesis de ácidos grasos de cadena larga (*ELOVL7*, *ACSL6*, *ACSL3*). La inducción de estos genes junto con la inducción de la expresión de la enzima PTGS2 y varios genes que codifican para fosfolipasa A2, sugiere que el metabolismo de prostaglandinas juega un rol en la infección.

Encontramos en este trabajo una alteración del metabolismo lipídico en la célula hospedera infectada, caracterizada por la acumulación de cuerpos o gotas lipídicas intracelulares, la inducción de transportadores que median el ingreso de colesterol a la célula así como genes que participan en el metabolismo de prostaglandinas.

2. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LOS CAMBIOS METABÓLICOS Y DE SUPERFICIE ASOCIADOS AL CICLO DE VIDA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Con el objetivo de estudiar los cambios en la expresión de moléculas de superficie y del metabolismo durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, realizamos secuenciado masivo de los distintos estadios del parásito para ver la transición a nivel transcriptómico. Debido a la relevancia de la regulación post transcripcional en tripanosomátidos quisimos evaluar el aporte de la regulación de los niveles de ARN mensajero en la expresión génica. Se ha demostrado que durante la transición de estadios en el ciclo de vida de tripanosomátidos, existe una importante modulación de los niveles tanto de ARN mensajero [33, 192] como de proteínas [193-195], lo cual le permite a estos organismos adaptarse rápidamente a los diferentes entornos y condiciones metabólicas que enfrentan durante su ciclo.

Estudiamos el transcriptoma de los tres estadios principales de *T. cruzi* mediante técnicas de secuenciado profundo debido a las ventajas que presenta esta técnica con respecto a la de microarreglos de ADN. Entre ellas podemos destacar que presenta una mejor relación señal/ruido, permite la identificación de nuevos transcriptos, tiene un mayor rango dinámico, posibilidad de cuantificación absoluta [196].

Realizamos dos librerías de cada estadio: epimastigotas (E3 y E7), amastigotas (A3 y A7) y tripomastigotas (T3 y T7) las cuales fueron secuenciadas con la tecnología Illumina. Luego del filtrado de los *reads* por calidad obtuvimos cerca de 4×10^7 *reads* para cada estadio, los cuales fueron mapeados contra el genoma de referencia Dm28c. La Tabla 3 muestra los resultados de la secuenciación.

Tabla 3: Estadísticas del RNA seq

Library	Read length	Total reads	Aligned reads	% Aligned reads	read counts in CDS*	% read counts in CDS*
A3	36	37.972.908	21.083.527	55,5	10.150.097	48,1
A7	72	6.011.870	2.644.677	44,0	1.314.640	49,7
T3	36	37.549.496	24.880.138	66,3	10.941.002	44,0
T7	72	2.976.919	1.604.848	53,9	716.431	44,6
E3	36	35.740.671	24.024.322	67,2	9.482.211	39,5
E7	72	8.540.435	5.496.063	64,4	2.192.983	39,9

* CDS extended 200bp at both sides

A: amastigotes, T: tryomastigotes, E: epimastigotes

Como se ve en la Tabla 3 entre el 44 y 67% de los *reads* están alineados contra el genoma de referencia (dependiendo de la muestra), lo cual es aceptable teniendo en cuenta que el genoma de Dm28c aún está incompleto. Dentro de los *reads* alineados, el 50% aproximadamente no es alineado con regiones codificantes de ADN CDS (“Coding DNA Sequence”), sino que lo hace mayoritariamente en regiones no traducidas UTR (“Untranslated Region”).

Dentro de los cambios a nivel transcriptómico encontrados, en este trabajo nos centramos en el estudio de moléculas de superficie, principalmente familias multigénicas (mucinas, transialidasas, MASP, DGF-1 y Gp63) muchas de las cuales han sido involucradas en el proceso de infección e interacción con las células hospederas [197-199]. Encontramos 560 genes que codifican para proteínas de superficie diferencialmente expresados durante el ciclo de vida, la mayoría de ellos 499 como era esperado se encontraron sobreexpresados en tripomastigotas. Sin embargo, el análisis más detallado de estos genes reveló que todas las familias presentan genes estadio específico así como genes cuyos transcritos no se detectan (Figura 21). Así como los genes que codifican proteínas de superficie se encuentran sobreexpresados en tripomastigotas (el estadio infectivo de parásito), la mayoría de estos genes se encuentran subexpresados

en epimastigotas (estadio no infeccioso), sin embargo existen algunos genes de transalidasas que se encuentran sobreexpresados específicamente en este estadio, como ya había sido descrito.

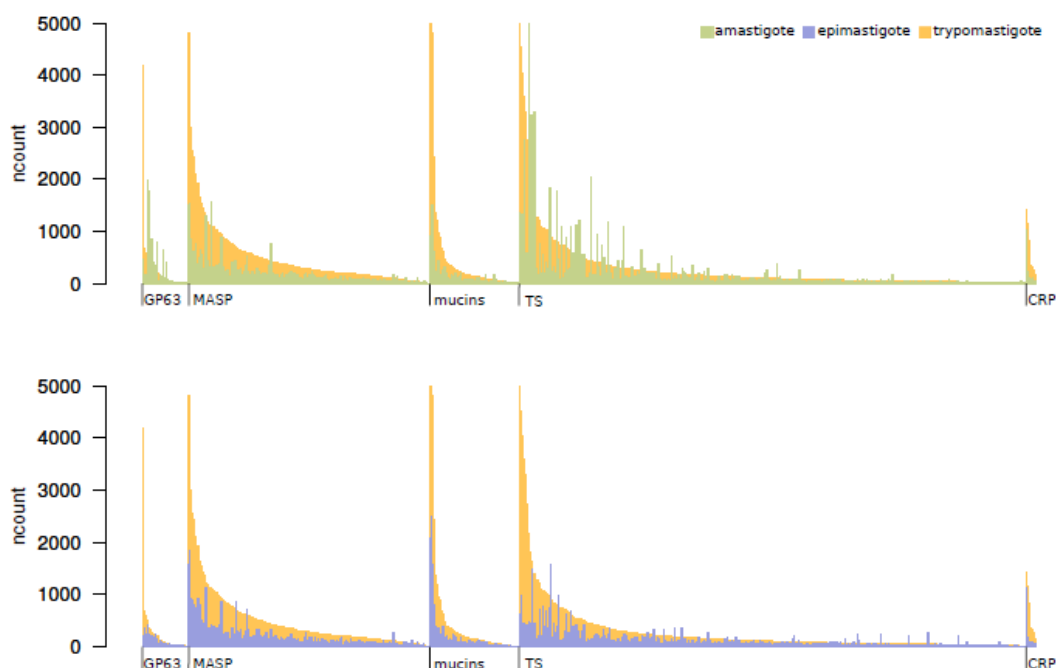


Figura 21: Representación gráfica de la expresión de cada gen en *reads* normalizados para los diferentes componentes de las proteínas de membrana. En el eje de las X cada gen es graficado en el mismo orden para los tres estadios; amastigotas (verde), tripomastigotas (amarillo) y epimastigotas (azul)

En esta tesis no detallaremos los resultados obtenidos en relación a las moléculas de superficie, pero sí algunas de las características metabólicas de cada estadio.

En primer lugar realizamos el análisis de los 500 genes más expresados en los tres estadios y comprobamos que la mayoría de ellos (277) son comunes a epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas. Estos genes comunes, codifican para proteínas vinculadas a la reestructuración celular mediada por microtúbulos, organización cromosómica, respuesta a estrés y organización de organelos, lo cual muestra los cambios morfológicos que sufre el parásito en cada estadio. Por otro lado, genes altamente expresados comunes a los tres estadios, codifican enzimas vinculadas a la activación de aminoácidos y al metabolismo proteico (síntesis, plegamiento y vías de degradación). Esto sugiere que la regulación traduccional y postraduccional puede jugar un rol relevante en la transición estadio específica del parásito (Tabla 4).

Tabla 4: Análisis de ontología génica (GO) con los 277 genes más expresados comunes a los tres estadios.

ID de GO	Término de GO	% de genes	Enriquecimiento	Valor p
GO:0007018	microtubule-based movement	21	5.47	0.00000232
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	20.3	5.3	0.00000316
GO:0007017	microtubule-based process	18.3	4.77	0.00000862
GO:0051276	chromosome organization	21.4	5.59	0.00129
GO:0006996	organelle organization	14.9	3.88	0.00331
GO:0016043	cellular component organization	10.4	2.71	0.0123
GO:0071840	cellular component organization or biogenesis	9.4	2.44	0.0144
GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	16	4.17	0.0206
GO:0043038	amino acid activation	16	4.17	0.0206
GO:0043039	tRNA aminoacylation	16	4.17	0.0206
GO:0044763	single-organism cellular process	5.5	1.44	0.0313
GO:0006950	response to stress	9.5	2.48	0.0404

Además de los 277 genes más expresados comunes a los tres estadios, cada estadio presenta genes específicos altamente expresados, con esos genes, realizamos el mismo análisis de ontología génica (Figura 22).

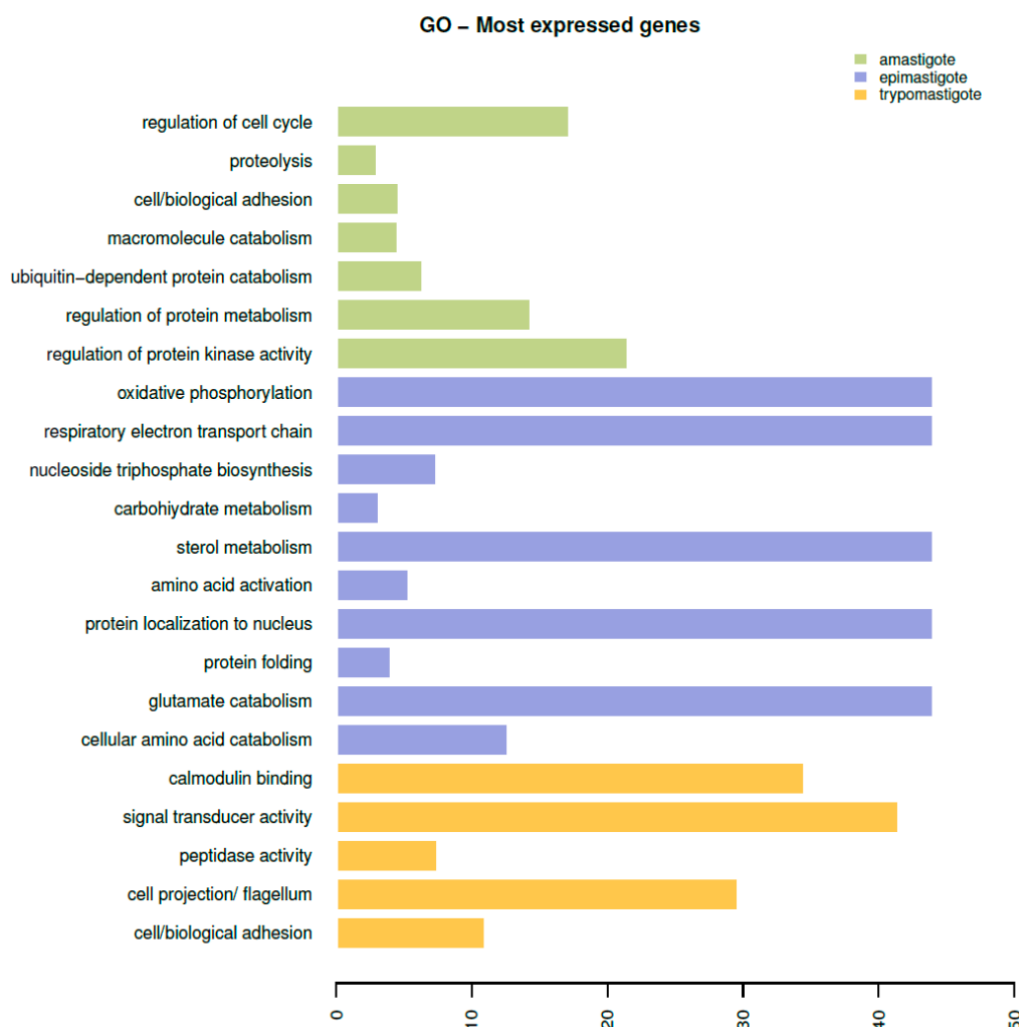


Figura 22: Análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO) con los genes más expresados específicos de cada estadio. Se muestra el valor de enriquecimiento para cada proceso (considerando un valor de FDR menor a 0,05) en cada estadio: amastigotas en verde, epimastigotas en azul y tripomastigotas en amarillo.

Cambios metabólicos durante el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

En primer lugar analizamos los genes relacionados al metabolismo oxidativo en los diferentes estadios, principalmente genes que codifican enzimas del ciclo de Krebs, cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. Como se puede ver en la gráfica de la Figura 23, existe una sobreexpresión de muchos genes vinculados al metabolismo aeróbico en el estadio presente en el insecto vector.

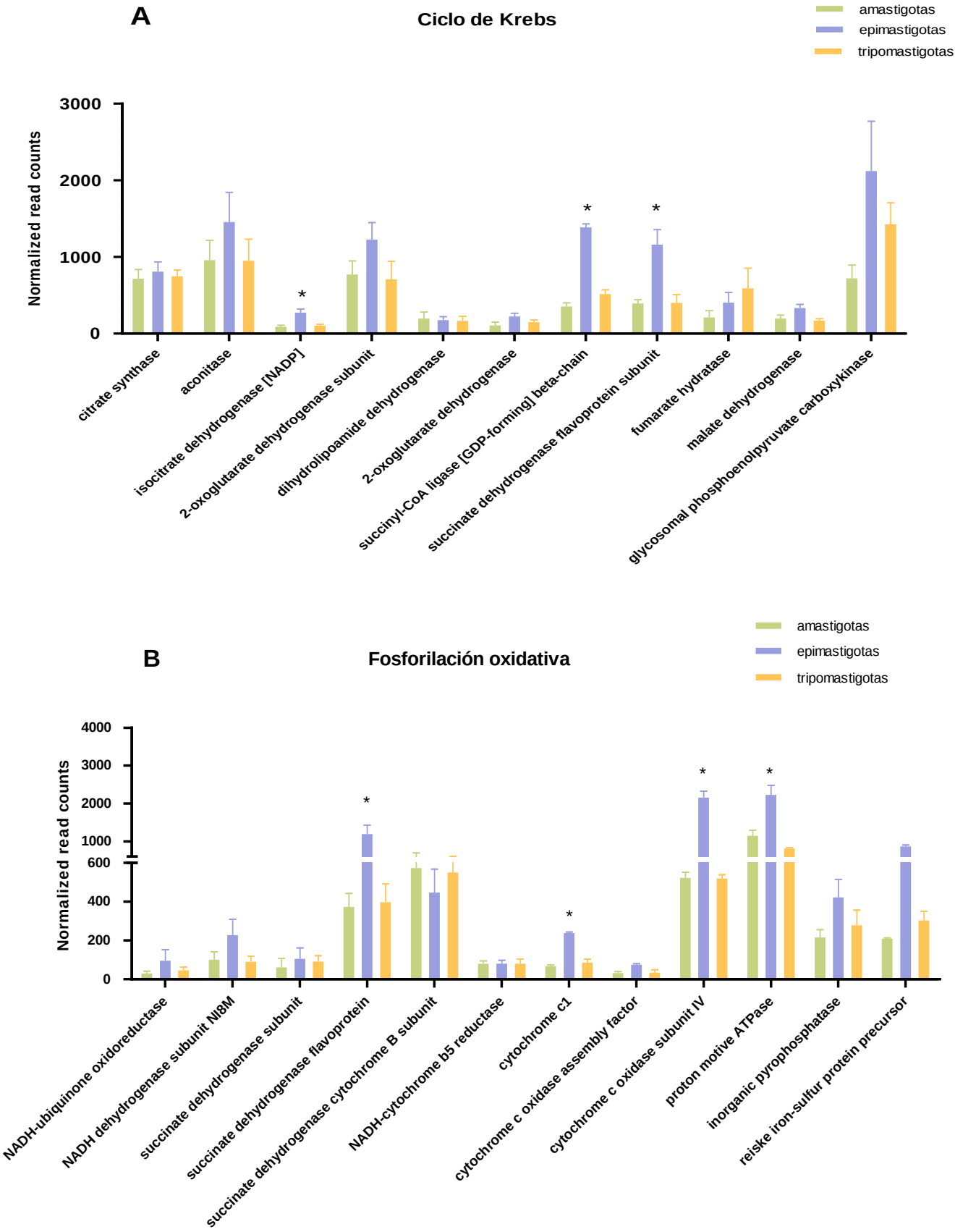


Figura 23: Expresión en conteos normalizados (ncounts) de genes que codifican enzimas del ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. Los asteriscos señalan genes diferencialmente expresados.

Con respecto a los genes que codifican componentes de la cadena respiratoria mitocondrial, encontramos una baja expresión de un gen que codifica para el complejo I NADH deshidrogenasa en todos los estadios, apoyando algunos resultados previos que mostraron que este complejo no es muy activo en *T. cruzi* [200]. Por otro lado, la respiración dependiente de succinato fue evidenciada en este estadio por la sobreexpresión de la fumarato reductasa dependiente de NADH.

Junto con el incremento en la expresión de genes vinculados al metabolismo aeróbico, encontramos también una sobreexpresión de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo lipídico en epimastigotas, en particular en la síntesis de compuestos esteroideos (Figura 24).

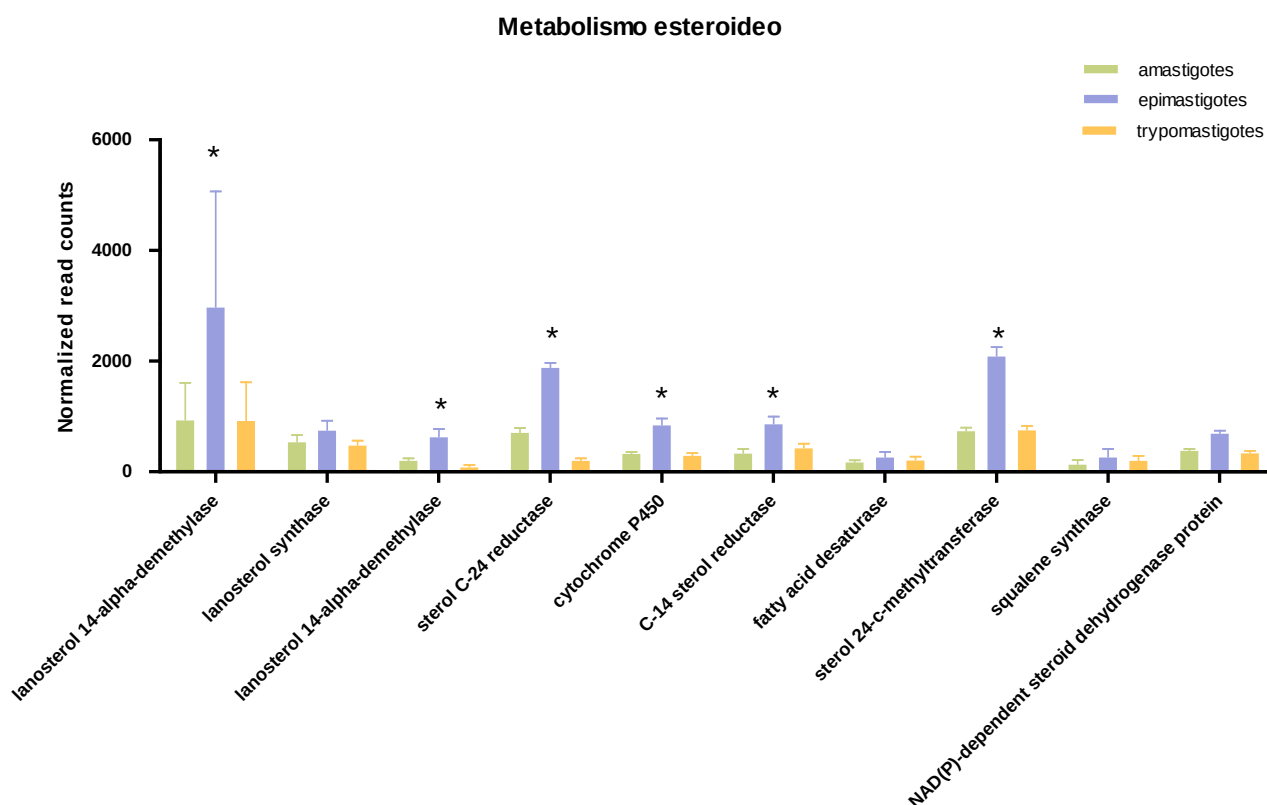


Figura 24: Expresión en *counts* normalizados (ncounts) de genes que codifican enzimas del metabolismo esteroideo. Los asteriscos señalan genes diferencialmente expresados.

Concomitantemente con el incremento relativo de la expresión de genes relacionados con el metabolismo aeróbico y esteroideo en epimastigotas, pudimos evidenciar varios genes de la vía de la ruta de las pentosas fosfato también sobreexpresadas en este estadio. Esto podría reflejar una mayor necesidad de NADPH el cual funciona como poder reductor tanto para la síntesis de lípidos como para mantener un

estado de homeostasis redox en el parásito. Adicionalmente, debido a que es un estadio replicativo, la vía de las pentosas fosfato proporciona ribosa fosfato para la síntesis de nucleótidos.

Al analizar la expresión de genes vinculados al metabolismo de la glucosa en los distintos estadios encontramos una gran disminución de los niveles de ARN mensajero de la hexoquinasa en el estadio intracelular amastigota. Por otro lado, al estudiar los niveles de expresión de los genes que codifican para las distintas enzimas de la vía glucolítica, vimos que presentan niveles muy diferentes en los niveles de ARN entre ellas. Como se puede ver en la Figura 25, tanto las primeras como las últimas enzimas de la vía se expresan mayormente a nivel de ARN.

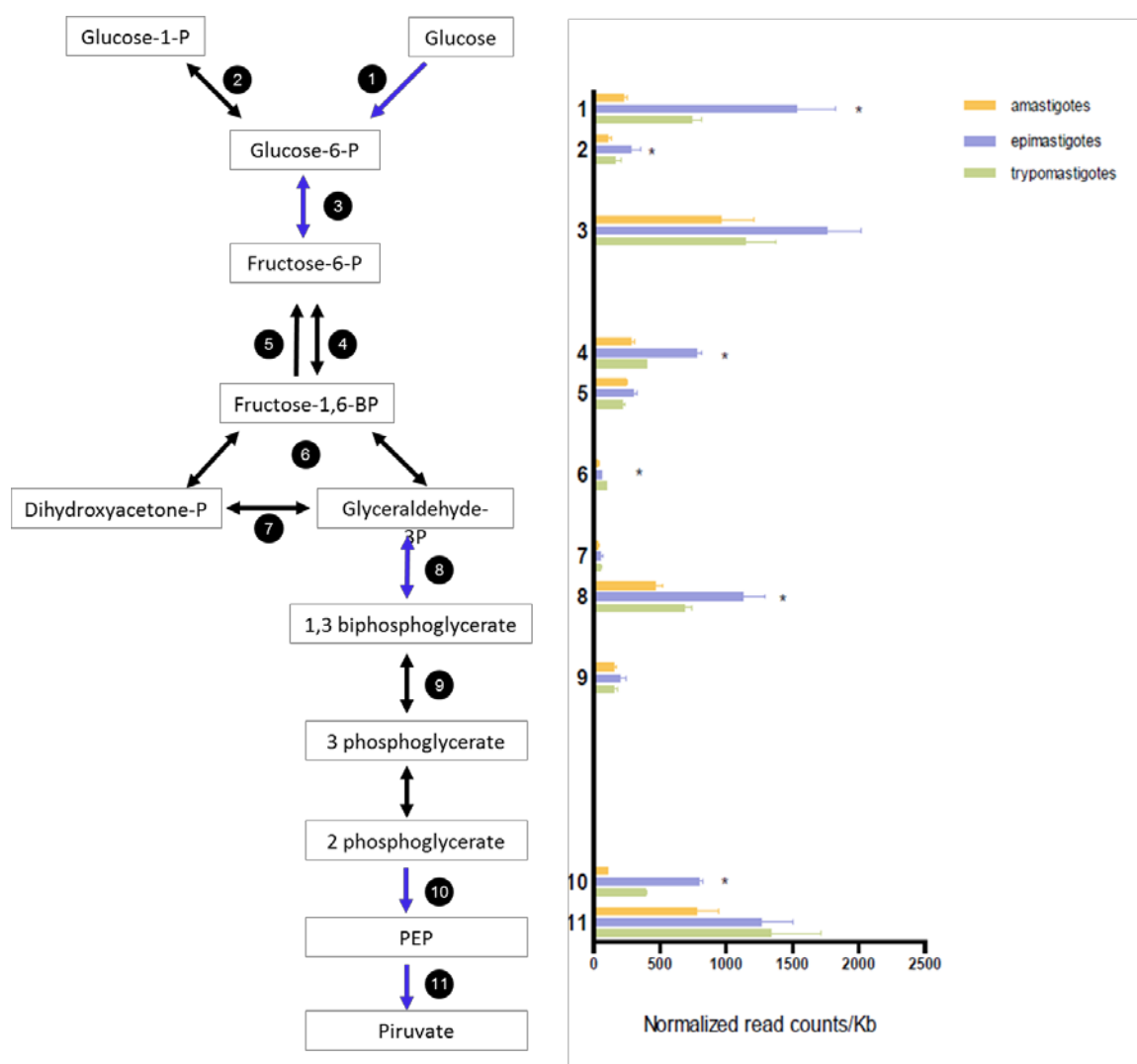


Figura 25: Esquema que representa el catabolismo de la glucosa (izquierda). A cada reacción se le asignó un número (1: hexoquinasa, 2: fosfoglucomutasa, 3: glucose-6-fosfato isomerasa, 4: fosfofructoquinasa, 5: fructosa-1,6-bifosfatasa, 6: aldolasa, 7: triosafofosfato isomerasa, 8: gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa, 9: fosfoglicerato quinasa, 10: enolasa y 11: piruvato quinasa) B) Expresión de los genes del metabolismo de la glucosa en counts normalizados por tamaño del gen en kilobases (Kb) en los tres estadios.

Finalmente analizamos la expresión de genes relacionados con el metabolismo proteico y pudimos detectar la expresión de varios genes que codifican para transportadores de aminoácidos en todos los estadios, sin embargo la expresión es mayor en los estadios proliferativos. Encontramos también una sobreexpresión de casi 10 veces del gen que codifica la enzima glutamato deshidrogenasa en epimastigotas así como una subexpresión de genes que codifican enzimas del metabolismo de aminoácidos en tripomastigotas, esto sugiere que los aminoácidos no son la principal fuente de energía en este estadio. Estos resultados se muestran en la Figura 26.

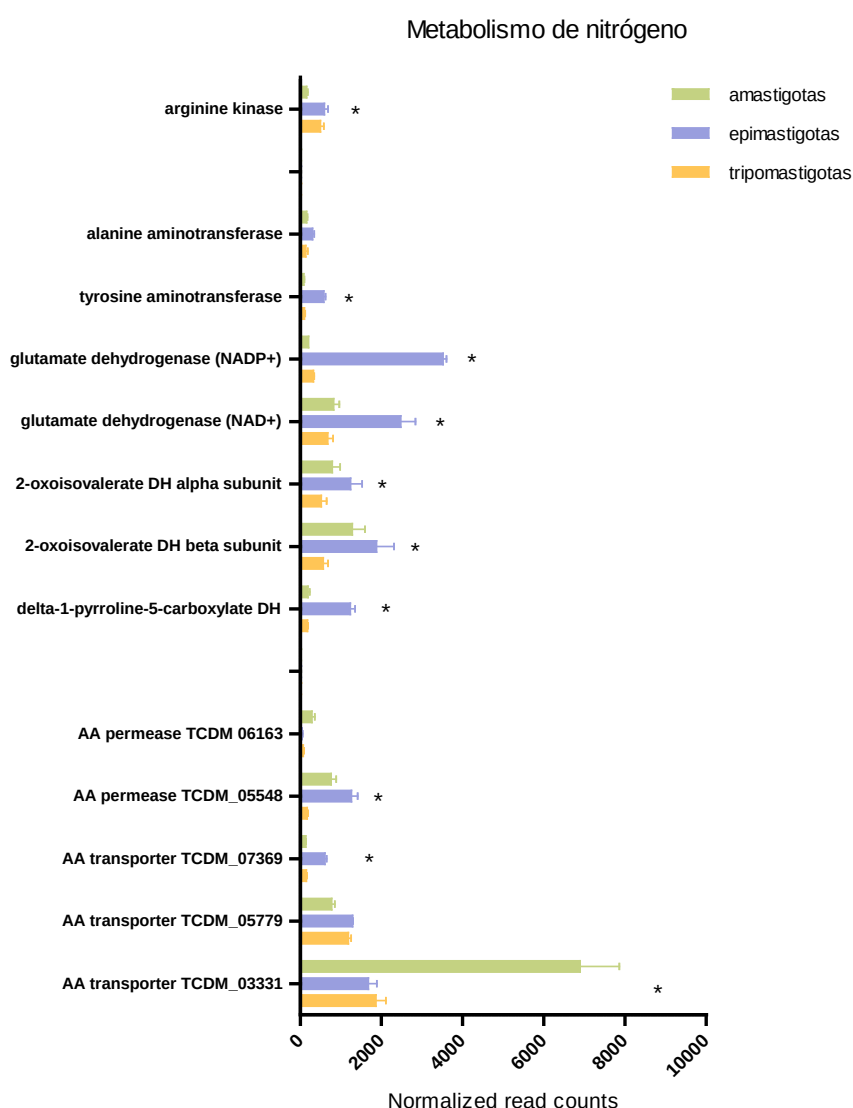


Figura 26: Expresión en *reads* normalizados (ncounts) de genes que codifican enzimas del metabolismo de nitrógeno. Los asteriscos señalan genes diferencialmente expresados.

Además del análisis de las distintas vías en todos los estadios, realizamos en este trabajo una comparación de los estilos de vida de los distintos estadios y su correlación con la expresión de genes. Al comparar los genes subexpresados en tripomastigotas con respecto a epimastigotas y/o amastigotas, vemos que existe una expresión relativamente baja de genes vinculados con el metabolismo aeróbico. En el mismo sentido, al analizar los genes sobreexpresados en tripomastigotas, encontramos que la hexoquinasa, aldolasa y enolasa están sobreexpresadas en este estadio. Estos resultados sugieren que el metabolismo energético de los tripomastigotas está basado principalmente en la glucólisis. Al comparar el estadio intracelular amastigota con el estadio extracelular tripomastigota, podemos observar que existe un cambio en el uso de combustibles en el estadio intracelular. En los amastigotas predominan genes que participan en el transporte de aminoácidos y de fosfolípidos, en tripomastigotas solo se encuentran sobreexpresados genes que participan en el metabolismo de carbohidratos, reflejando la disponibilidad de sustratos en el interior celular y en la sangre. La Figura 27 resume las principales características encontradas en cada estadio combinando los datos de expresión diferencial y genes más expresados.

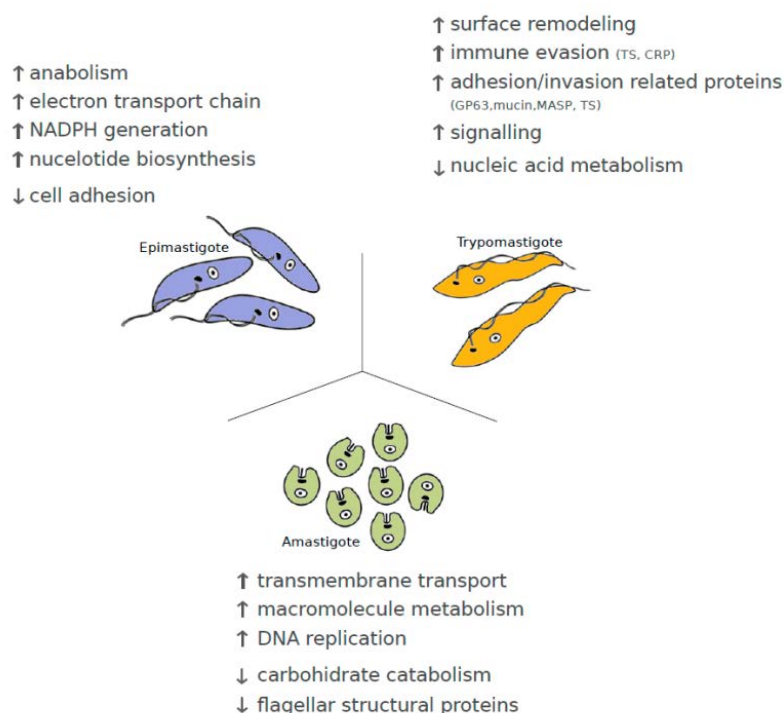


Figura 27: Diagrama que representa los tres estadios de *Trypanosoma cruzi* estudiados y las principales características de cada estadio encontradas a nivel transcriptómico.

3. INTERACCIÓN DE LA TRIPARREDOXINA PEROXIDASA CITOSÓLICA CON EL HOSPEDERO MAMÍFERO

En esta tercera parte de la tesis, nos planteamos como objetivo el estudio de la interacción entre *T. cruzi* y las células de mamífero mediada por moléculas secretadas. Debido a que en nuestro laboratorio se ha trabajado durante mucho tiempo con los sistemas antioxidantes de *T. cruzi*, y a que contamos con herramientas específicas de gran utilidad, nos centramos en el estudio de la enzima triparredoxina peroxidasa citosólica (cTXNPx).

Secreción de Triparredoxina peroxidasa citosólica de *Trypanosoma cruzi*

Contábamos ya en nuestro laboratorio con anticuerpos policlonales de ratón y de conejo para cTXNPx y también para la forma mitocondrial de la proteína mTXNPx, y con cTXNPx salvaje, cTXNPxC52S (mutante en la cisteína peroxidática), mTXNPx salvaje recombinantes expresada en la cepa M15 de *Escherichia coli*, y con líneas de parásitos que sobreexpresan mTXNPx, cTXNPx y cTXNPxC52S en el vector de expresión pTREX [55].

Como primer objetivo, nos planteamos determinar si cTXNPx era secretada al medio en condiciones normales de cultivo tanto en el estadio epimastigota como en tripomastigotas. Para el estudio en epimastigotas, realizamos curvas de crecimiento de los parásitos en medio de cultivo, tomando muestras de sobrenadantes a los días 1, 4, 6 y 8 (Figura 28A), las cuales fueron analizadas por Western blot. Por otro lado, para analizar la secreción en el estadio infectivo, tripomastigotas derivados de células fueron incubados en PBS con 5 % de glucosa por dos horas y el sobrenadante se analizó de la misma manera por Western blot. Para este ensayo, se utilizaron sobrenadantes de tripomastigotas transfectados con plásmido control pTREX, con el plásmido pTREX-cTXNPx y con el plásmido pTREX-cTXNPxC52S, para evaluar una correlación entre la sobreexpresión y la secreción al medio en el estadio infectivo. La Figura 28B muestra los resultados obtenidos con el estadio tripomastigota. Estos resultados demuestran que cTXNPx es secretada durante el crecimiento exponencial de epimastigotas, siendo el pico máximo de expresión en el día 4 del cultivo. Además, el estadio infectivo tripomastigota también secreta la proteína al medio de cultivo y que existe una mayor secreción de las proteínas en las líneas que sobreexpresan las proteínas salvajes y mutantes.

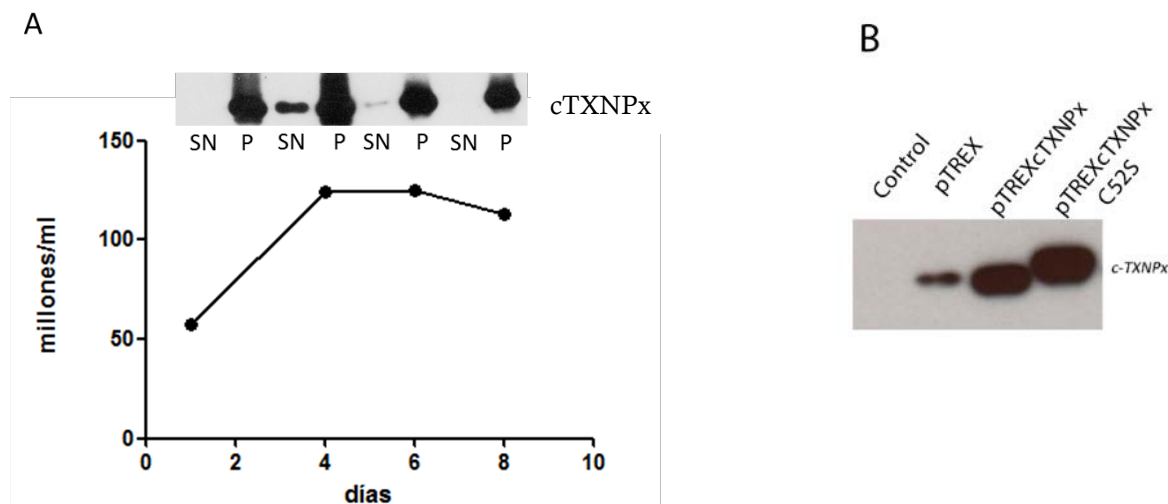


Figura 28: A) Western blot de sobrenadantes (SN) y extractos proteicos (P) con anticuerpo anti cTXNPx durante la curva de crecimiento de epimastigotas partiendo de 10×10^6 parásitos/mL, las muestras fueron tomadas a los días 1, 4, 6 y 8. B) Western blot de sobrenadantes de tripomastigotas pTREX, pTREX-cTXNPx, pTREX-cTXNPxC52S o control (sobrenadante sin parásitos). En ambos casos para el Western blot se utilizó el anticuerpo anti cTXNPx de conejo el cual reconoce tanto la forma salvaje como la mutante de la proteína. El peso molecular del monómero es de 25 kDa.

Es importante resaltar que cTXNPx no posee péptido señal ni ninguna secuencia de secreción clásica, por lo que probablemente la liberación de la proteína sea por una vía no clásica, como la mayoría de las proteínas secretadas por este parásito [87, 88]. Dentro de las vías de secreción no clásica, una de las más comunes es la secreción de proteínas asociadas a vesículas extracelulares (EV) [201]. La secreción de vesículas extracelulares ha sido muy estudiada en los últimos años, y la capacidad de secretar vesículas extracelulares ha sido demostrada en tripanosomátidos [87, 93, 202].

En ese contexto, nos preguntamos si cTXNPx se secreta asociada a EVs o de una manera independiente de EVs. Cabe destacar que la purificación y caracterización proteómica por espectrometría de masa de las EVs de *T. cruzi* que realizamos en este trabajo fue previa a la publicación del artículo de Bayer-Santos y colaboradores [87].

Nuestro protocolo de purificación de vesículas extracelulares se basó en centrifugación diferencial a partir de sobrenadantes de epimastigotas sometidos a estrés nutricional, ya que durante el estrés se produce una mayor secreción de vesículas, como se describió previamente [203].

La presencia de EVs en epimastigotas y tripomastigotas fue visualizada directamente utilizando microscopía electrónica de barrido, tanto en parásitos control como en estresados nutricionalmente. La Figura 29 evidencia la presencia de vesículas extracelulares en epimastigotas, siendo mayor su liberación luego del estrés nutricional. En el caso de los tripomastigotas se detectó la presencia de vesículas en toda la superficie del parásito (a diferencia de los epimastigotas que tienen una localización flagelar) aún en ausencia de estrés nutricional.

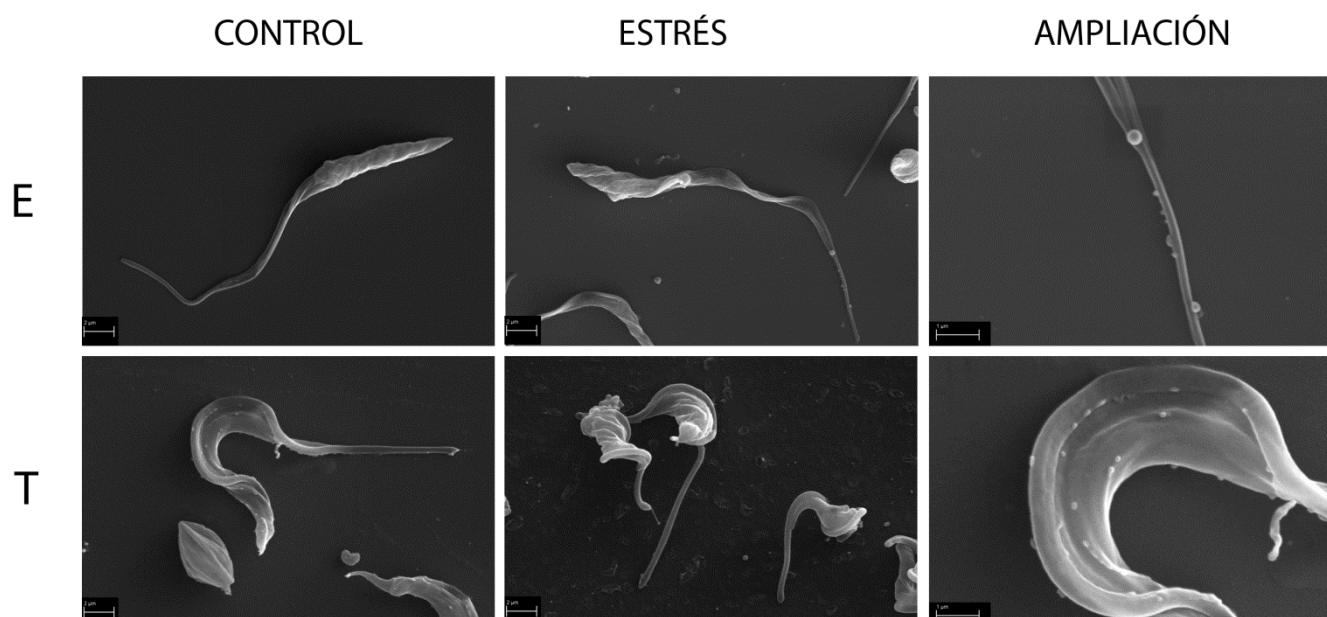


Figura 29: Microscopía electrónica de barrido de epimastigotas (E) y tripomastigotas (T) control y estresados nutricionalmente. En la tercera columna se muestra un aumento de la imagen mostrando la presencia de vesículas en la superficie del parásito. Las barras indican 2μm sin aumento y 1μm con aumento

Para determinar la presencia de cTXNPx en la fracción secretada por los parásitos utilizamos tres abordajes diferentes, por un lado espectrometría de masa de las vesículas purificadas para la identificación de péptidos de interés, en segundo lugar realizamos Western blot con las fracciones de la purificación de EVs y por último realizamos inmunomicroscopía electrónica con las vesículas purificadas.

El análisis proteómico por espectrometría de masa de las EVs de epimastigotas de *T. cruzi*, se realizó en colaboración con el Dr. Carlos Batthyány de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo y permitió la identificación de 28 proteínas, las cuales fueron

detectadas en al menos dos de 5 experimentos diferentes. Al comparar las proteínas encontradas en nuestro abordaje con aquellas identificadas en el caso de otros tripanosomátidos, observamos que alrededor del 50% de las proteínas son comunes a las encontradas en secretomas de *Leishmania* y de *T. brucei* [93, 204]. Por otro lado, cerca del 80% de las proteínas identificadas en nuestro estudio son comunes a las ya identificadas en el secretoma de epimastigotas de *T. cruzi* [87]. De nuestro análisis surge que un porcentaje muy alto (más del 70%) de las proteínas presentes en las EV de *T. cruzi*, también fueron identificadas en el proteoma de reservosomas de epimastigotas [205]. Esto sugiere que podría existir un vínculo entre este organelo de almacenamiento y la biogénesis de las vesículas secretadas.

El análisis de ontología génica de las 28 proteínas presentes en vesículas secretadas, mostró un enriquecimiento de procesos biológicos vinculados a la remodelación de la cromatina, empaquetamiento del ADN, plegamiento proteico y organización de organelos (Tabla 5); sugiriendo que las proteínas secretadas por el parásito en el interior celular podrían jugar un rol en la regulación epigenética del hospedero. Péptidos correspondientes a cTXNPx fueron identificados en 3 de 5 experimentos, así como en los datos publicados por Bayer Santos en 2013 [87] donde la proteína se encontró secretada tanto en epimastigotas como en tripomastigotas metacíclicos. El análisis de las fracciones donde la proteína es encontrada, nos permitió concluir que se secreta tanto en vesículas de distintos tamaños así como en la fracción libre de vesículas, sugiriendo que existen distintos mecanismos para la salida de cTXNPx al exterior celular. También fue detectada la presencia de cTXNPx en el exoproteoma de tripomastigotas derivados de células de la cepa Y [88]. A diferencia de cTXNPx, mTXNPx no fue identificada en el proteoma que realizamos, ni tampoco en los secretomas publicados [87, 88], sugiriendo mecanismos específicos de liberación de proteínas y no por ejemplo por lisis celular. Dentro de las proteínas identificadas, ninguna presenta una localización mitocondrial, sugiriendo también que este organelo no participaría en gran medida en la biogénesis de vesículas secretadas. La baja proporción de proteínas mitocondriales en estudios proteómicos anteriores, también apoya esta hipótesis [87].

Tabla 5: Análisis de ontología génica de las proteínas encontradas en las vesículas extracelulares de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

ID GO	Término GO	% genes	Enriquecimiento	Valor de p
GO:0042026	protein refolding	100.0	490.5	4.07e-3
GO:0051258	protein polymerization	14.3	70.07	1.62e-2
GO:0006334	nucleosome assembly	12.5	61.31	5.45e-4
GO:0031497	chromatin assembly	12.5	61.31	5.45e-4
GO:0034728	nucleosome organization	12.5	61.31	5.45e-4
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	12.5	61.31	5.45e-4
GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	12.5	61.31	5.45e-4
GO:0006323	DNA packaging	11.1	54.5	6.76e-4
GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	10.5	51.63	7.46e-4
GO:0071103	DNA conformation change	8.7	42.65	1.06e-3
GO:0034622	cellular macromolecular complex assembly	8.3	40.88	4.88e-5
GO:0065003	macromolecular complex assembly	7.3	35.89	7.04e-5
GO:0034621	cellular macromolecular complex subunit organization	7.0	34.22	8.06e-5
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	6.3	30.66	1.10e-4
GO:0071844	cellular component assembly at cellular level	6.0	29.43	1.24e-4
GO:0006325	chromatin organization	5.6	27.25	2.46e-3
GO:0043623	cellular protein complex assembly	5.6	27.25	3.80e-2
GO:0022607	cellular component assembly	5.5	26.75	1.62e-4
GO:0051276	chromosome organization	4.5	22.3	3.59e-3
GO:0006461	protein complex assembly	4.3	21.33	4.78e-2
GO:0070271	protein complex biogenesis	4.3	21.33	4.78e-2
GO:0044085	cellular component biogenesis	3.6	17.52	5.41e-4
GO:0006457	protein folding	3.6	17.52	5.66e-3
GO:0071842	cellular component organization at cellular level	1.9	9.37	3.18e-3
GO:0006996	organelle organization	1.8	8.68	2.12e-2
GO:0016043	cellular component organization	1.8	8.66	3.98e-3

Con el objetivo de analizar el tamaño y la forma de las vesículas liberadas por epimastigotas, y para detectar la presencia de cTXNPx en las mismas, realizamos la purificación de las vesículas y posteriormente las visualizamos por microscopía electrónica e inmunomicroscopía electrónica. Mostramos una representación de las vesículas frescas analizadas por contrastación negativa (Figura 30A) y el inmunomarcado de las vesículas con el anticuerpo anti cTXNPx (Figura 30B). Las vesículas de epimastigotas son redondeadas, de tamaño heterogéneo y su diámetro varía entre 50 y 500 nm aproximadamente. Se logró visualizar la marcación de cTXNPx tanto en las vesículas de mayor tamaño como en las más pequeñas e incluso en regiones electródensas que parecen carecer de vesículas extracelulares.

Las vesículas purificadas fueron sometidas en paralelo al inmunomarcado con mTXNPx en ese caso no se obtuvo inmunomarcación (resultados no mostrados).

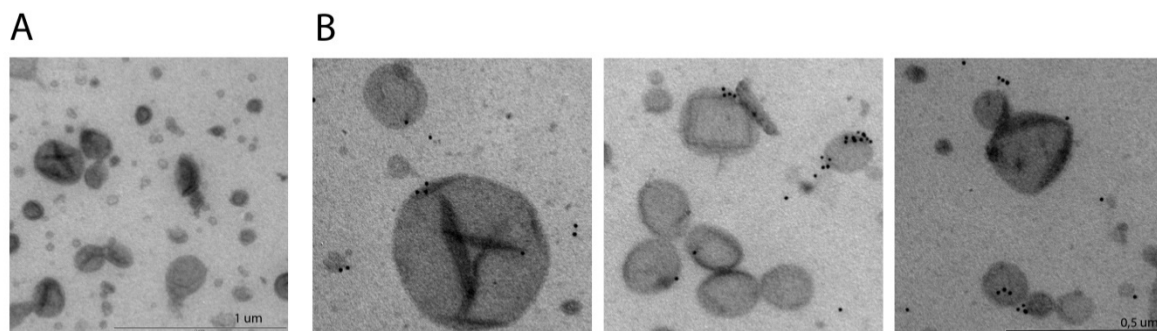


Figura 30: A) Microscopía electrónica de transmisión de vesículas purificadas de epimastigotas sometidos a estrés nutricional, la barra indica 1µm. B) Inmunolocalización de cTXNPx utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti cTXNPx, la barra indica 0,5 µm

Finalmente, analizamos las vesículas mediante Western blot agregando también una fracción libre de vesículas, la cual se obtuvo como sobrenadante de la ultracentrifugación de las vesículas. En el Western blot se observa un extracto de epimastigotas, las vesículas y la fracción libre de vesículas de epimastigotas así como vesículas obtenidas de tripomastigotas (Figura 31). Utilizando esta técnica, tampoco se pudo detectar la presencia de mTXNPx utilizando anticuerpos específicos (resultados no mostrados).

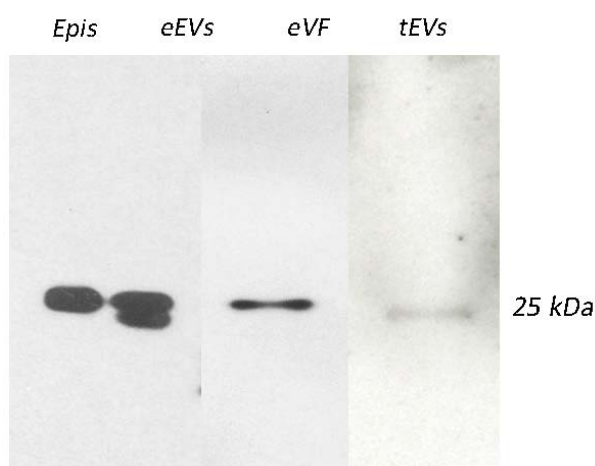


Figura 31. Western blot con 25 µg de extracto de epimastigotas (Epis), vesículas extracelulares purificadas de epimastigotas (eEVs), fracción libre de vesículas obtenida de epimastigotas (eVF) y vesículas extracelulares purificadas de tripomastigotas (tEVs). La detección se realizó con un anticuerpo policlonal que reconoce cTXNPx 1/5000.

Como se muestra en la Figura 31, se logró detectar cTXNPx en la fracción de vesículas extracelulares purificadas de epimastigotas y de tripomastigotas (eEVs y tEVs), así como también en la fracción libre de vesículas de epimastigotas (eVF). Esta fracción libre de vesículas es la obtenida en el sobrenadante de la ultracentrifugación a 100000g durante 90 minutos. Nuestros resultados indican que cTXNPx se secreta al medio de cultivo asociada a EVs y también libre de vesículas.

Interacción de cTXNPx con células de mamífero

Interacción con células epiteliales

La presencia de cTXNPx en vesículas secretadas por el parásito y en sobrenadantes libres de vesículas, nos llevó a preguntarnos si la proteína era capaz de ingresar o al menos interactuar con las células hospederas. Ya que la interacción puede ser distinta cuando la proteína se encuentra asociada o no a vesículas, decidimos explorar las dos posibilidades. En primer lugar, estudiamos la capacidad de cTXNPx de interactuar con células de mamíferos mediante vesículas secretadas. Para ello, realizamos ensayos de interacción de células epiteliales (líneas Vero y HeLa) incubando las vesículas purificadas durante 10 minutos, 1 hora y 6 horas a 37°C. Posteriormente se realizó una inmunofluorescencia para la localización de cTXNPx, utilizando como control negativo células incubadas con medio de cultivo sin vesículas. Como se muestra en la Figura 32, la proteína del parásito se encuentra en la superficie de las células luego de tan solo 10 minutos de interacción de las vesículas con las células, y este marcado aumenta conforme aumenta el tiempo de interacción.

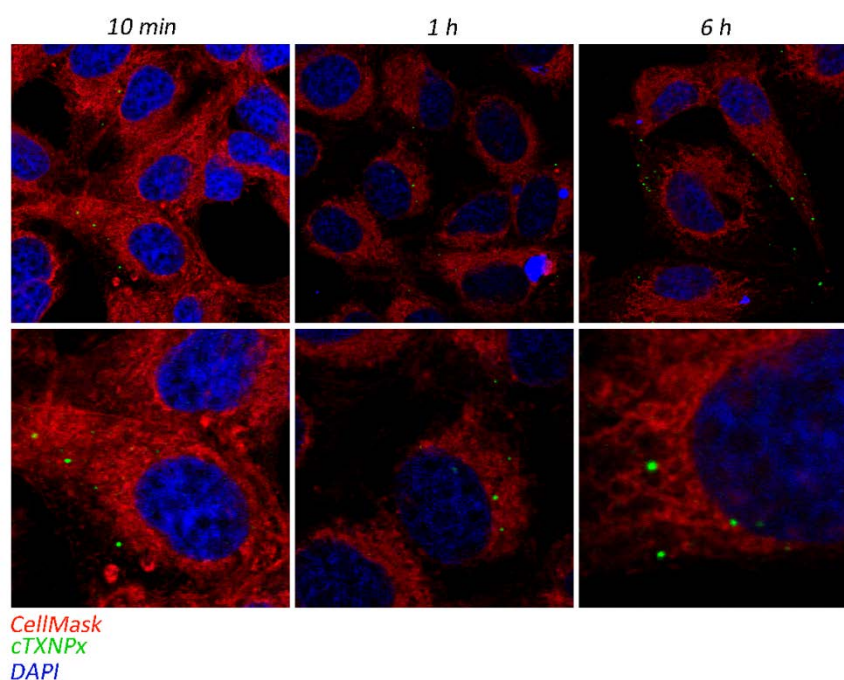


Figura 32: Inmunofluorescencia indirecta de células Vero incubadas con vesículas extracelulares de epimastigotas durante 10 minutos, 1 hora o 6 horas. En verde se observa la marca con el anticuerpo anti cTXNPx, en rojo el marcador de membranas CellMaskTM y en azul la tinción nuclear con DAPI.

Para poder visualizar el contorno celular se utilizó el marcador fluorescente CellMask el cual se une a las membranas celulares. Las imágenes que sugieren que la proteína podría alcanzar el interior celular, sin embargo se necesitaría realizar microscopía de superresolución o una colocación más precisa para determinarlo con mayor exactitud.

Como segundo modelo de interacción utilizamos la proteína recombinante cTXNPx para estudiar su interacción con las células en un contexto libre de vesículas. Estas condiciones no están alejadas de las fisiológicas ya que como demostramos anteriormente, la proteína es secretada sin asociación con vesículas (Figura 31) y [87]. La purificación de cTXNPx fue realizada a partir de extractos de *Escherichia coli* como se describe en materiales y métodos; además de la purificación por afinidad, la proteína fue nuevamente purificada para remover los restos de lipopolisacárido (LPS) que podrían contaminar la muestra. Los ensayos de interacción con cTXNPx recombinante fueron realizados sobre dos modelos celulares diferentes; células HeLa y macrófagos murinos. Para los estudios de microscopía de fluorescencia utilizamos dos herramientas diferentes: el anticuerpo anti cTXNPx por un lado y por otro la conjugación de la proteína a un fluoróforo (Atto647) en el grupo amino terminal (Nt). Junto con el marcado fluorescente de cTXNPx, realizamos en paralelo el marcado de mTXNPx y cTXNPxC52S para ver si la interacción era específica y dependiente de la actividad peroxidasa.

En primer lugar decidimos estudiar el efecto de la dosis de cTXNPx sobre la unión, para ello utilizamos diferentes concentraciones de proteína (5 µg/mL, 10 µg/mL y 30 µg/mL) y una incubación de una hora a 37°C. Luego de la interacción se realizó el inmunomarcado con el anticuerpo específico. En la Figura 33A se visualiza la marcación correspondiente a cTXNPx localizada principalmente en la superficie celular. Vemos también que la marcación es menor al disminuir la concentración de proteína agregada. La dependencia de la interacción con la concentración de proteína se cuantificó midiendo la intensidad de fluorescencia media (MIF) en distintos campos (Figura 33B), observándose que la interacción de la proteína con las células es dosis dependiente. Podemos observar que incluso utilizando concentraciones tan bajas como 5 µg/mL podemos detectar la proteína en la superficie celular. El control negativo no mostró marcación (Figura no mostrada).

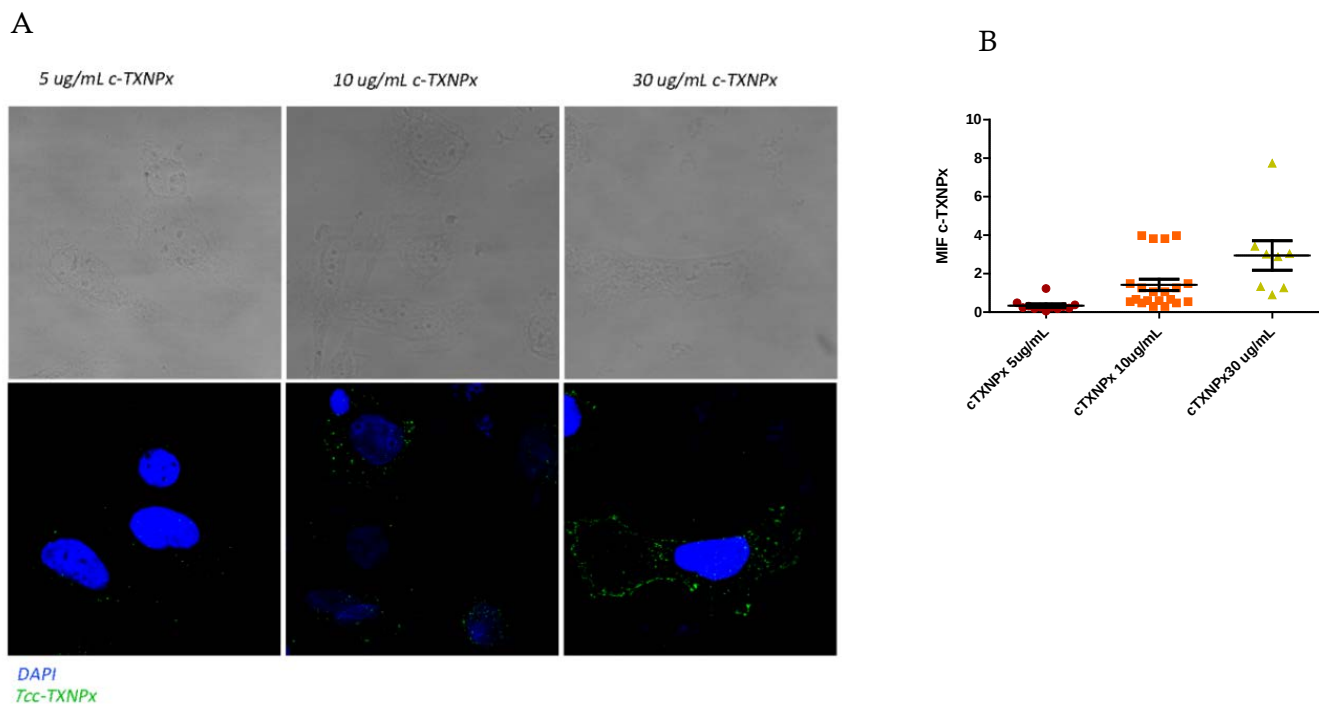


Figura 33. A: Inmunofluorescencia indirecta de células HeLa incubadas con cTXNPx a distintas concentraciones (5,10 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 hora. En verde se observa la marca con el anticuerpo anti cTXNPx, y en azul la tinción nuclear con DAPI. B: Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia en las distintas condiciones analizadas

El segundo abordaje para estudiar la interacción fue utilizar la proteína fluorescente (cTXNPxAtto647), para visualizar el contacto directo evitando así la utilización de ensayos indirectos con anticuerpos. En la Figura 34 se visualiza la interacción de cTXNPxAtto647 con células a dos temperaturas (37°C y 4°C) incubadas durante una o seis horas. A 37°C se puede localizar a la proteína en la superficie celular, sin embargo, luego de seis horas de interacción, una parte importante de la marcación se encuentra en el interior de la célula. A diferencia de lo que ocurre a 37°C , al realizar el ensayo de interacción a 4°C vemos que la proteína se localiza exclusivamente en la superficie celular, incluso luego de seis horas de interacción. Estos resultados indicarían que la entrada de cTXNPx a las células epiteliales está mediada por un proceso activo como la endocitosis.

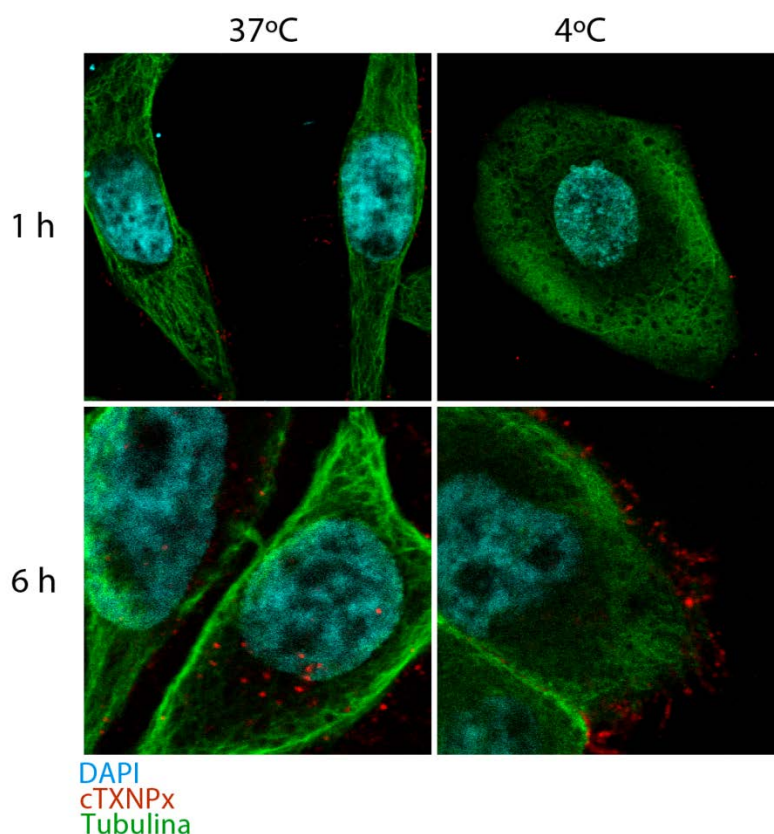


Figura 34: Interacción de cTXNPxAtto647 (1 μ M) con células HeLa durante una y seis horas a dos temperaturas diferentes (37°C y 4°C). Luego de la interacción, las células fueron inmunomarcadas con anticuerpo anti tubulina y el núcleo fue teñido con DAPI.

Con el fin de estudiar la localización de cTXNPxAtto647 en relación a la marca obtenida utilizando el anticuerpo específico, las células fueron incubadas a dos temperaturas (37 y 4°C) con cTXNPxAtto647 durante seis horas. Luego de este período, las células fueron fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con el anticuerpo anti cTXNPx y observadas en el microscopio confocal (Figura 35). Nuestros resultados indican que el anticuerpo anti cTXNPx es capaz de reconocer a cTXNPxAtto647 en la superficie de las células (color amarillo) a ambas temperaturas. Por otro lado, vemos que existe marcación con el anticuerpo que no colocaliza con cTXNPxAtto, lo cual puede deberse a que la marcación de cTXNPx con Atto647 no es completa. Por último, en el interior celular pudimos visualizar exclusivamente a cTXNPxAtto647 sin colocalizar con la marca del anticuerpo. Esto podría ser causa de una falta de accesibilidad del anticuerpo al antígeno por un problema de permeabilización parcial por ejemplo. También, estos resultados podrían indicar una degradación de la proteína (por ejemplo por enzimas lisosomales) y por lo tanto una pérdida de epítomos, con la permanencia de la marca del fluoróforo.

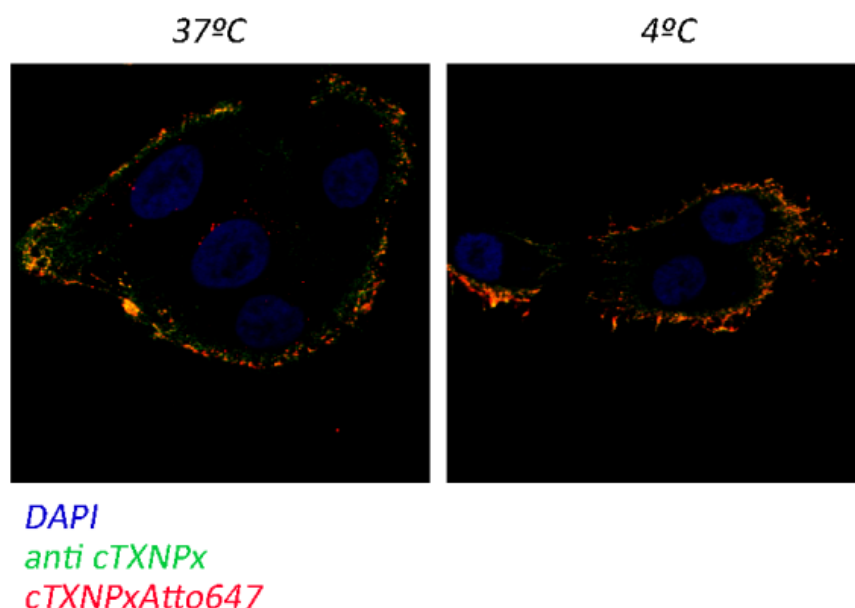


Figura 35: Inmunofluorescencia de células HeLa incubadas con cTXNPxAtto647 (1 μ M) a 4°C y a 37°C. Las células fueron marcadas con el anticuerpo anti cTXNPx (verde) y cTXNPxAtto647 se visualiza en rojo. Los núcleos de las células fueron visualizados con DAPI.

Posteriormente analizamos la interacción de mTXNPxAtto647 (la forma mitocondrial que no fue detectada en sobrenadantes de *T. cruzi*) y la comparamos con cTXNPxAtto647 con el objetivo de evaluar si la interacción era específica de la forma secretada. Por otro lado, también comparamos la interacción de las células con cTXNPxAtto647 con la de cTXNPXC52S Atto647, con el propósito de evaluar si la actividad enzimática o cambios estructurales asociados al estado redox podrían ser necesarios para la interacción con células de mamífero. Como se puede ver en la Figura 36, tanto cTXNPx como cTXNPXC52S son capaces de interactuar aparentemente con las células humanas, por lo tanto concluimos que esta interacción es independiente de la actividad enzimática. En cuanto a la comparación con mTXNPx, mostramos que existe una selectividad para la forma citosólica que es la secretada por el parásito ya que la marcación fue sensiblemente menor con mTXNPx, teniendo en cuenta que la fluorescencia por mol de proteína era comparable en todos los casos.

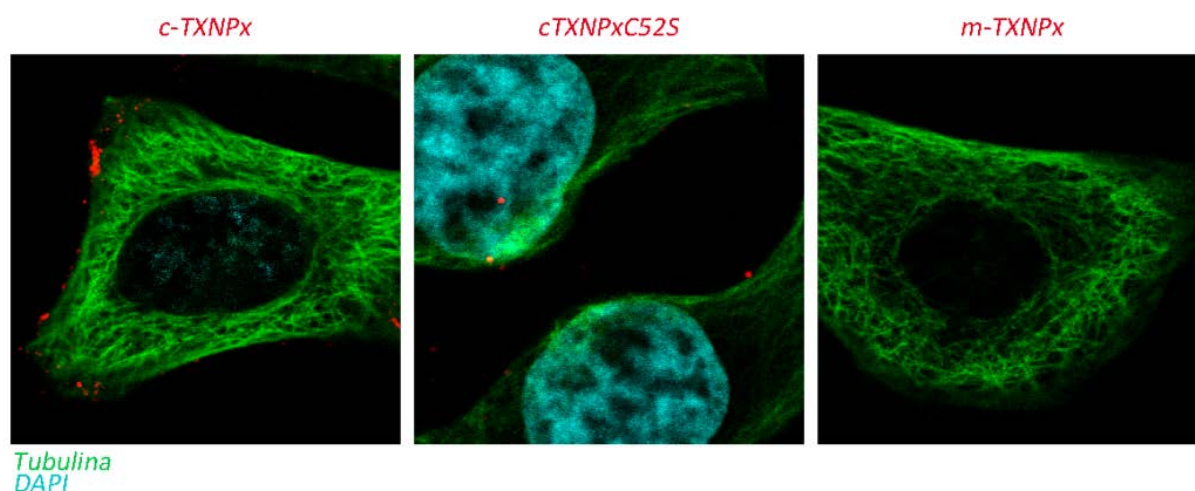


Figura 36: Inmunofluorescencia de células HeLa incubadas durante 1 hora a 37°C con cTXNPx, cTXNPxC52S y mTXNPx conjugadas a atto647 a una concentración de 0,5μM. EL inmunomarcado fue realizado con un anticuerpo anti tubulina y los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Nuestros resultados anteriores sugieren que cTXNPx es capaz de ingresar a las células por endocitosis, debido principalmente a la dependencia con la temperatura. Para poder evaluar mejor la participación de la vía endocítica en la incorporación de cTXNPx, realizamos ensayos de inmunofluorescencia con marcadores de endosomas de reciclaje y tardíos (Rab11, Rab7 respectivamente) y con la lectina que se une a glicanos de superficie ricos en N-acetil-glucosamina denominada “wheat germ agglutinin” o WGA. Debido a la permeabilización de las células previo al tratamiento con WGA, esta también se unió a los residuos glucídicos intracelulares presentes en el retículo endoplásmico y en el Golgi (Figura 37A). Adicionalmente se marcaron los lisosomas con un anticuerpo que reconoce la proteína LAMP1 y las imágenes fueron analizadas en un microscopio de superresolución para determinar con mayor certeza el ingreso de la proteína marcada al interior celular (Figura 37B). Los resultados mostrados en la Figura 37 indican que existe una colocalización parcial con el marcador de endosomas tardíos Rab7, las imágenes obtenidas con superresolución muestran que la marca de la proteína se encuentra dentro de los lisosomas, cuando es internalizada. Sin embargo, como vimos con resultados anteriores, una parte de cTXNPx permanece superficial y colocaliza con WGA. La colocalización de cTXNPx con Rab7, LAMP1 y WGA indica que luego de la interacción, hay una internalización de la proteína por endocitosis a pesar que esta también permanece superficial, sin embargo aún no podemos determinar si se une a algún receptor específico o inespecíficamente (Figura 37).

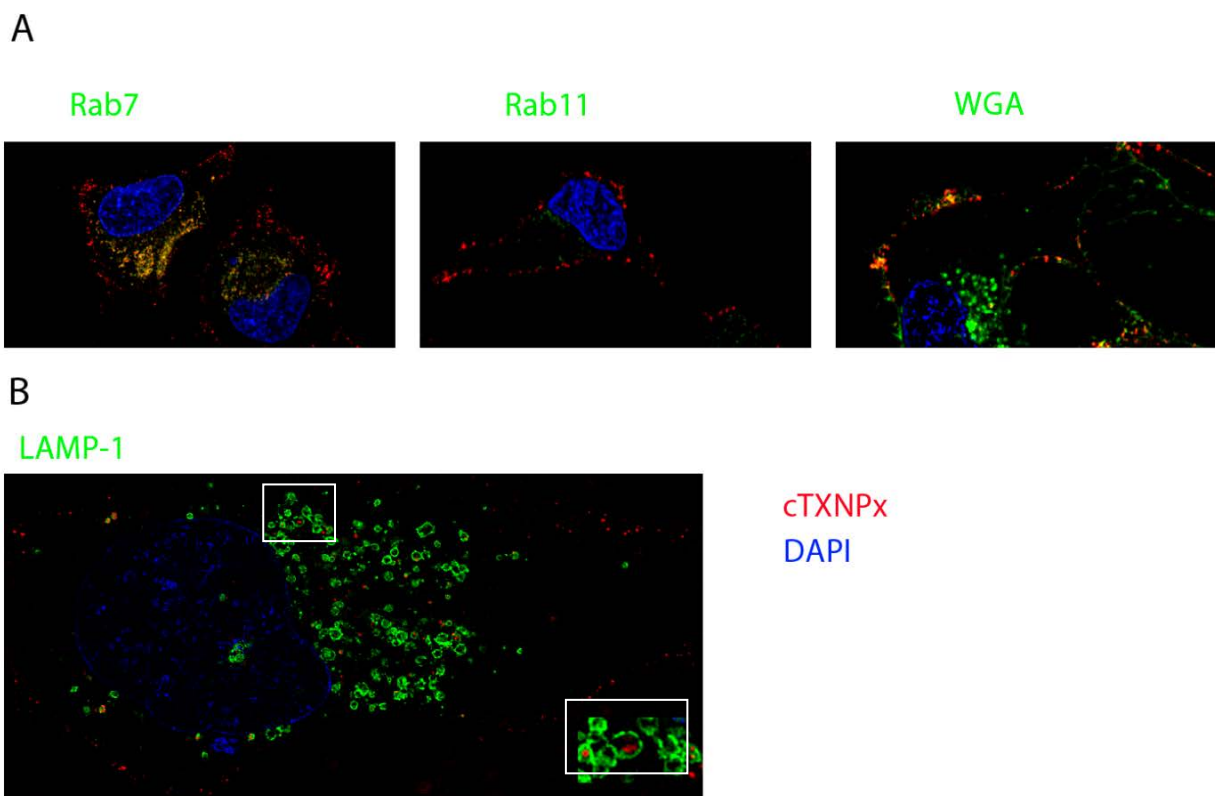


Figura 37: Localización de cTXNPx con componentes de la vía endocítica tras 4 horas de interacción de la proteína con células HeLa a 37°C. A) Comarcado de cTXNPx con un marcador de endosoma tardío (Rab7), de reciclaje (Rab11)) y de superficie WGA. B) Microscopía de superresolución de cTXNPx con lisosomas (visualizado con LAMP1).

Interacción de cTXNPx con macrófagos

Además de estudiar la interacción de cTXNPx con células epiteliales, en este trabajo también analizamos la capacidad de cTXNPx de interactuar con macrófagos, utilizando dos modelos; la línea celular J774, macrófagos peritoneales de ratón. De la misma manera que analizamos la interacción de cTXNPx con células epiteliales, en esta parte trabajamos tanto con la proteína sin marcar como conjugada a Atto647.

Con el objetivo de estudiar la cinética de la interacción, incubamos la línea celular con cTXNPx durante 10 minutos o 4 horas a 37°C, evaluando los resultados por inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 38, la proteína es observada intracelularmente pudiéndose detectar luego de tan solo 10 minutos de interacción. Estos resultados sugieren que la interacción de cTXNPx con macrófagos es diferente que con células epiteliales, como discutiremos más adelante.

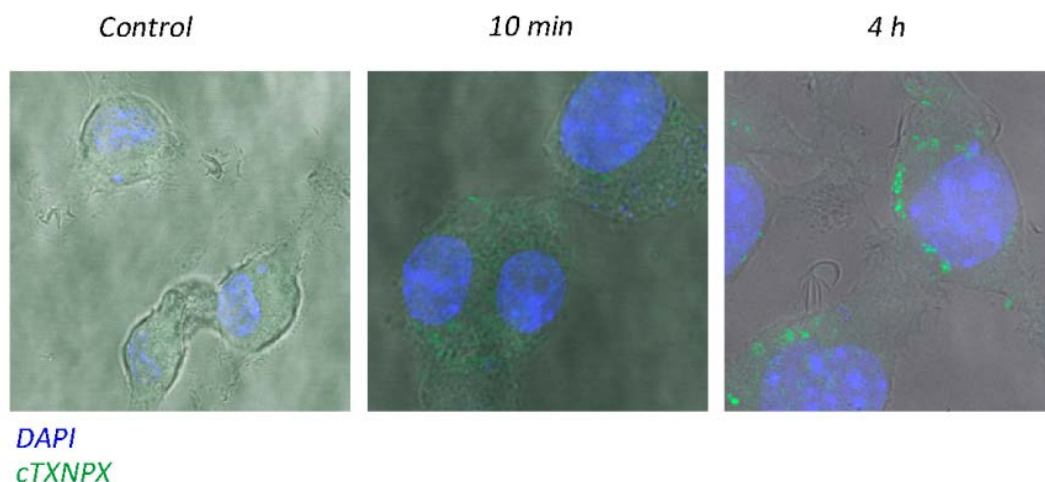


Figura 38: Inmunofluorescencia de macrófagos murinos J774 incubados con cTXNPx 1 μ M durante 10 minutos y 4 horas a 37°C o con medio de cultivo (control negativo). En verde se visualiza el marcado con el anticuerpo anti cTXNPx y en azul los núcleos teñidos con DAPI. Las imágenes están superpuestas sobre el campo claro para visualizar el contorno celular

Para poder estudiar si el proceso de internalización era mediado por endocitosis, incubamos macrófagos peritoneales con cTXNPx-Atto647 durante una hora para luego analizar la colocación con lisosomas utilizando el anticuerpo anti LAMP1. Los resultados indican que existe una internalización de cTXNPx por la vía endocítica ya que existe una localización al menos parcial en lisosomas (Figura 39).

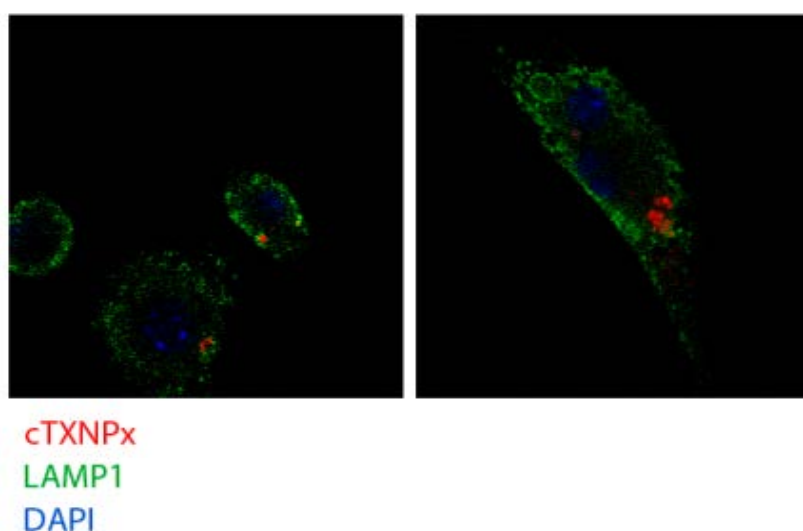


Figura 39: Inmunofluorescencia de macrófagos peritoneales murinos incubados con cTXNPx-Atto647N 1 μ M durante 1 hora a 37°C. Luego de la fijación las células fueron inmunomarcadas con el anticuerpo anti Lamp1 para visualizar lisosomas (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Como una manera alternativa de demostrar si la proteína era endocitada/fagocitada por los macrófagos, realizamos ensayos de interacción a dos temperaturas diferentes (4° y 37°C) y con distintas concentraciones de cTXNPxAtto647 y células adherentes de la cavidad peritoneal (PEC). Para evaluar si la interacción con este tipo celular también era independiente de la actividad peroxidasa, también incubamos las células con cTXNPxC52S Atto647 a las mismas concentraciones que la proteína salvaje. Las PEC fueron marcadas para detectar el marcador de macrófagos F4/80 y la interacción fue analizada por citometría de flujo, cuantificando la intensidad de fluorescencia media (MIF) de atto647 en células F480⁺. La Figura 40 muestra la diferencia en la interacción a 37° o a 4°C; mientras que a 37°C se ve un aumento continuo de la fluorescencia (lo que indica la internalización de ambas proteínas) a 4°C el aumento de la fluorescencia es menor, lo que podría estar indicando una saturación de la unión de ambas proteínas a la superficie celular, sin endocitosis. Estos resultados sugieren por un lado que la internalización de cTXNPx en macrófagos es un proceso dependiente de la temperatura, y por otro lado que la interacción de la proteína con las células es independiente de la actividad peroxidasa de la proteína ya que cTXNPxC52S también es capaz de interactuar con los macrófagos. De todas maneras, a juzgar por la fluorescencia, la interacción con cTXNPxC52S es menor que con cTXNPx.

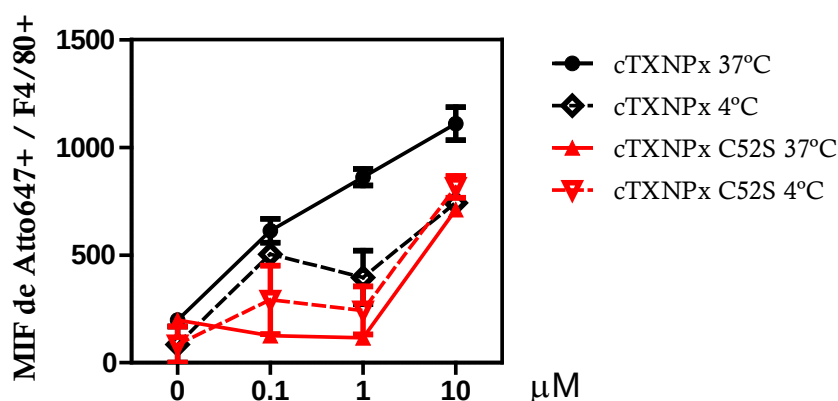


Figura 40: Citometría de flujo con células peritoneales incubados con concentraciones crecientes (0,1, 1 y 10 μM) de cTXNPx (negro) o cTXNPxC52S (rojo) a 37°C o a 4°C durante 1 hora. Se grafica la intensidad de fluorescencia media de Atto647 (MIF) en la población positiva para F4/80.

Al comprobar la capacidad de cTXNPx de ingresar a las células tanto asociada a vesículas extracelulares como libre de vesículas, nos preguntamos cuál es el efecto de la proteína en los dos modelos celulares previamente mencionados. Comenzaremos primero con el estudio del efecto de cTXNPx en células epiteliales (línea celular HeLa), posteriormente en dos modelos de macrófagos murinos y por último

estudiamos la respuesta inmune a la proteína en un modelo *in vivo* de ratón, teniendo en cuenta que la endocitosis y degradación de antígenos es fundamental para la presentación de antígenos por los macrófagos.

Efecto de cTXNPx sobre las células epiteliales

Con el objetivo de tener una aproximación al efecto de cTXNPx sobre las células epiteliales, y teniendo en cuenta reportes que indican que la peroxirredoxina humana es capaz de interactuar con el receptor TLR4 e inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias [206], evaluamos la capacidad de cTXNPx de inducir citoquinas en este modelo. Para ello, las células fueron incubadas con dos concentraciones de cTXNPx (1 y 0,2 μ M) durante seis horas, utilizando como referencia los experimentos previamente realizados con la Prx1 humana [133]. Decidimos evaluar en primer lugar la inducción de IL8, IL6 e IL1A por PCR en tiempo real ya que estas citoquinas mostraron ser altamente inducidas durante la infección (Tabla 1). La gráfica 41 muestra el cambio de expresión (*fold change*) de las células incubadas con respecto al control, donde se observa una importante inducción de IL8 a las dos concentraciones y en menor medida de IL6.

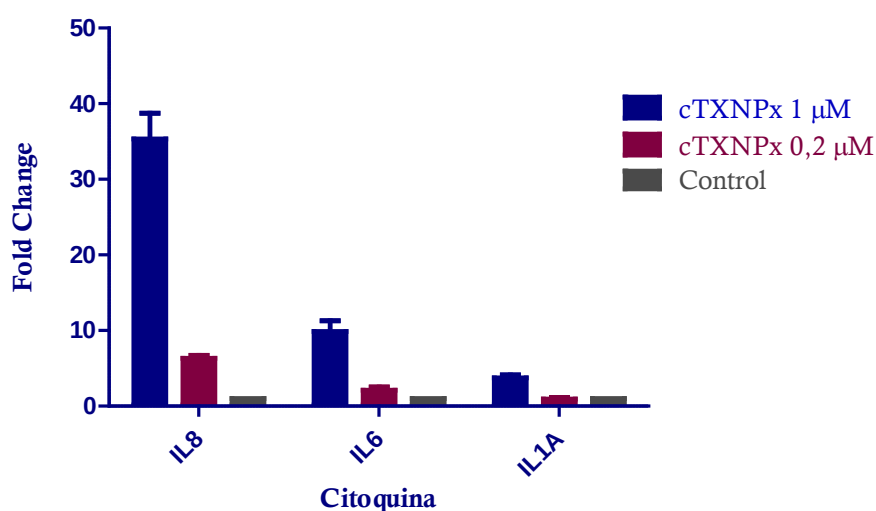


Figura 41: PCR en tiempo real de células HeLa incubadas con cTXNPx recombinante a dos concentraciones (0,2 y 1 μ M) a 37°C por 6 horas. El ARN extraído se utilizó para hacer ADN copia y PCR en tiempo real utilizando cebadores para IL8, IL6 e IL1A humanos. Los cambios de expresión fueron expresados en referencia al gen normalizador GAPDH utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$.

Alteraciones transcriptómicas en células tratadas con cTXNPx

Posteriormente, el estudio de la respuesta de las células a la peroxirredoxina de *T. cruzi* fue abordada globalmente a nivel de cambios generales en los niveles de ARN mediante secuenciado profundo del ARN (RNAseq). Para ello las células fueron incubadas con cTXNPx 1 μ M durante 6 horas o con medio de cultivo como control.

En la Tabla 6 se muestra la cantidad de lecturas (*reads*) obtenidos luego de los controles de calidad, así como el porcentaje de *reads* mapeados en el genoma para cada condición.

Tabla 6: Datos generales del RNAseq de células HeLa tratadas con cTXNPx durante 6 horas

Muestra	Reads recortados	Reads mapeados	Reads asignados
cTXNPx C	11894016	8988544 (75.6%)	7668906 (64.5%)
cTXNPx C	10106053	7727603 (76.5%)	6604040 (65.3%)
Control A	10282193	7232309 (70.3%)	5939406 (57.8%)
Control C	9447933	7155147 (75.7%)	6095875 (64.5%)

Luego del análisis (realizado por la Lic. Florencia Díaz) de expresión diferencial utilizando el paquete edgeR, y considerando un valor de cambio de expresión mayor o igual a 2 y un valor de p menor a 0,05 se obtuvo una lista con 293 genes sub expresados en las células tratadas y 327 genes que aumentaban su expresión luego el tratamiento con cTXNPx. El análisis de ambas listas de genes fue realizado con el programa Funrich [207] que permite estudiar y representar gráficamente distintas características de los genes en estudio. Realizamos el análisis de ontología génica analizando aquellos procesos y vías biológicas enriquecidas en el transcriptoma estudiado, así como también los compartimentos subcelulares más representados en las listas de genes obtenidas. Algunos de los resultados obtenidos se encuentran graficados en la Figura 42 donde analizamos los compartimentos subcelulares más representados para los genes sobreexpresados (izquierda) y subexpresados (derecha).

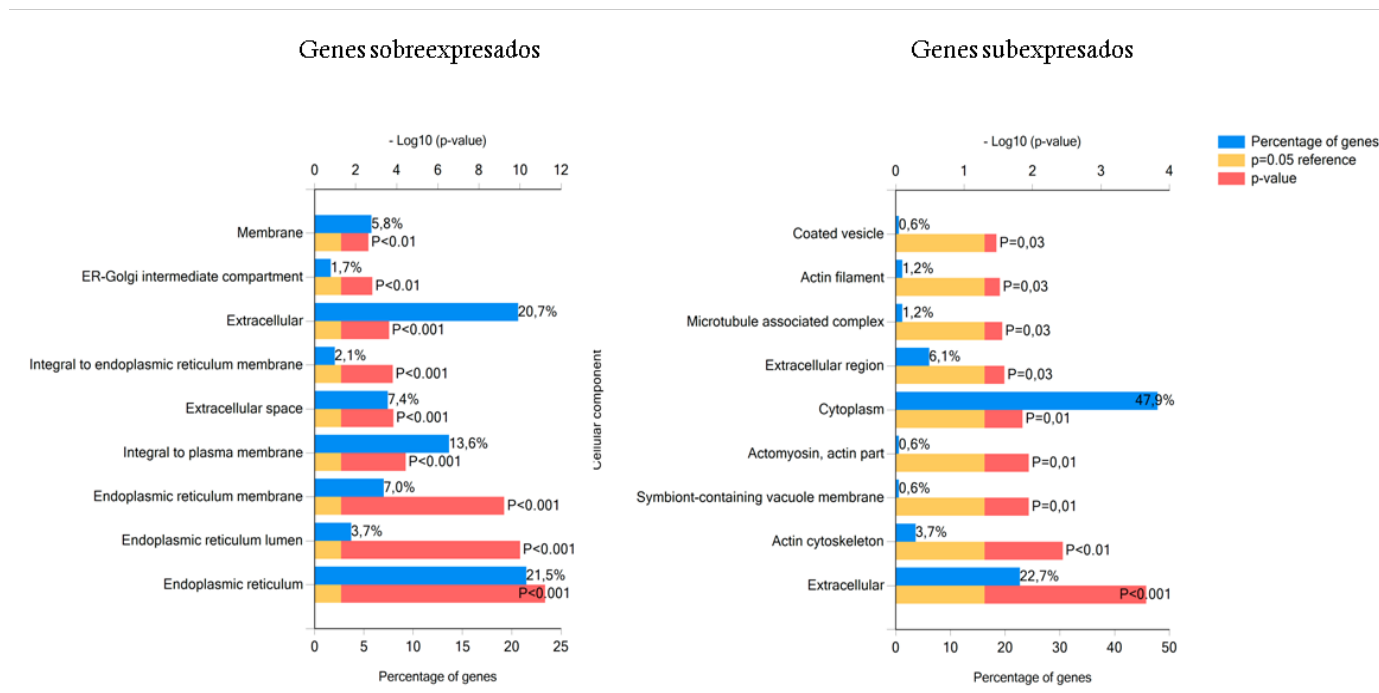


Figura 42: Análisis de ontología génica (GO) de genes diferencialmente expresados frente al tratamiento con cTXNPx. Se muestra los componentes celulares enriquecidos para los genes sobreexpresados (izquierda) y subexpresados (derecho). Las barras azules muestran el porcentaje de genes de la lista, la barra amarilla es el valor de p de referencia 0,05 y en rojo el valor de p de cada categoría.

Al examinar los compartimentos celulares afectados frente al tratamiento con cTXNPx, observamos una clara diferencia entre los genes sobreexpresados y los subexpresados; los genes sobreexpresados pertenecen mayoritariamente a compartimentos de la vía de endocitosis/exocitosis como retículo endoplásmico (RE), Golgi y de compartimento extracelular, aunque también está involucrada la membrana plasmática. Por otro lado, el análisis de los genes subexpresados, muestra que los procesos alterados están principalmente en el citoplasma de la célula, y en menor medida en el compartimento extracelular. Además del análisis de los componentes celulares más representados en la lista de genes, realizamos un estudio de los procesos biológicos más enriquecidos (Figura 43).

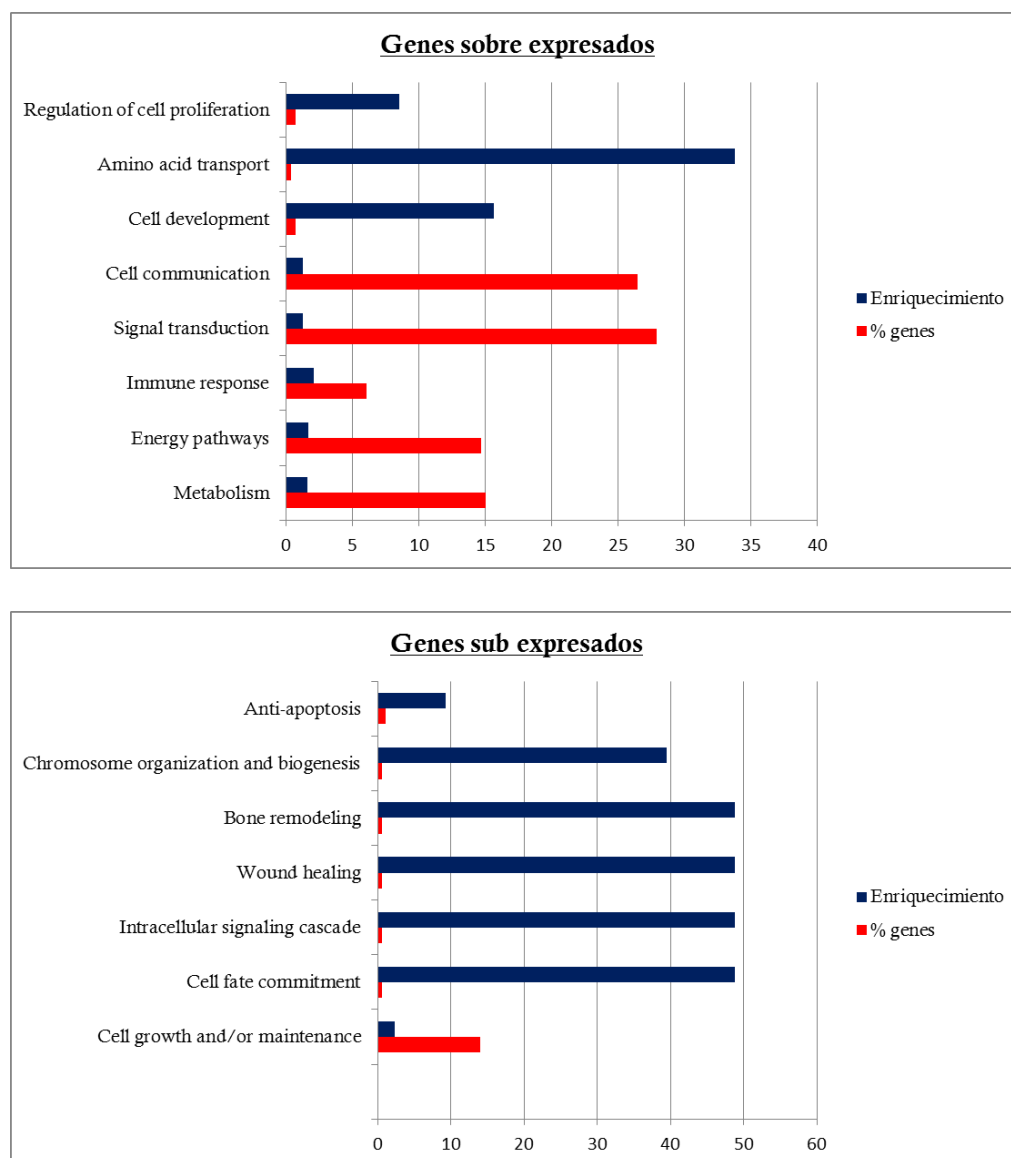


Figura 43: Análisis de ontología génica (GO) de genes diferencialmente expresados frente al tratamiento con cTXNPx. Se muestra los procesos biológicos significativamente representados para los genes sobreexpresados (arriba) y subexpresados (abajo). Las barras rojas muestran el porcentaje de genes de la lista, la barra azul muestra el enriquecimiento de genes en cada proceso

El análisis de los procesos biológicos alterados durante el tratamiento con cTXNPx muestra que existe una modificación en la expresión de genes que participan en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, proliferación celular, sistema inmune y comunicación entre células (analizando genes sobreexpresados). Por otro lado, al estudiar los genes subexpresados vemos un predominio de procesos vinculados a la resistencia a la apoptosis, organización cromosómica y crecimiento y mantenimiento celular.

El detalle de las vías biológicas más alteradas frente a la incubación con cTXNPx se muestra en la Tabla 6 (analizando los genes sobreexpresados únicamente). Como se puede ver, una de las vías más alteradas es la respuesta a proteínas mal plegadas UPR, del inglés “Unfolded Protein Response” la cual tiene lugar principalmente en el retículo endoplásmico. Notoriamente existe un enriquecimiento importante de vías vinculadas al metabolismo del colesterol, y también de respuesta inmune, particularmente señalización vía TLR.

Tabla 7: Análisis de vías biológicas alteradas utilizando los genes sobre expresados frente al tratamiento con cTXNPx.

Biological pathway	Percentage of genes	Fold Enrichment	p-value
Unfolded Protein Response	13.48	13.72	4.25538E-17
Cholesterol biosynthesis	8.51	26.30	1.90868E-15
PERK regulated gene expression	4.96	28.40	1.04351E-09
Activation of Chaperones by IRE1alpha	7.80	11.68	2.47702E-09
Metabolism of lipids and lipoproteins	12.06	2.98	9.66338E-05
Calnexin/calreticulin cycle	2.84	16.71	0.000125108
N-glycan trimming in the ER and Calnexin/Calreticulin cycle	2.84	15.54	0.000177424
Immune System	17.73	2.13	0.000369684
epoxysqualene biosynthesis	1.42	42.17	0.000548791
Activation of Chaperones by ATF6-alpha	2.13	17.49	0.000962895
Asparagine N-linked glycosylation	4.96	4.45	0.002083128
LPA receptor mediated events	5.67	3.85	0.002301799
IL23-mediated signaling events	4.26	4.55	0.004328494
AP-1 transcription factor network	17.73	1.79	0.004511846
Post-translational protein modification	5.67	3.38	0.00517205
Cytokine Signaling in Immune system	7.80	2.67	0.005303381
Integrin-linked kinase signaling	17.73	1.70	0.00872921
Hypoxic and oxygen homeostasis regulation of HIF-1-alpha	4.26	3.76	0.010961351
FOXA transcription factor networks	4.26	3.72	0.011615331
ATF-2 transcription factor network	3.55	4.37	0.012102218
Validated transcriptional targets of AP1 family members Fra1 and Fra2	5.67	2.91	0.012700804
IL12-mediated signaling events	4.96	3.16	0.013887062
IL1-mediated signaling events	7.80	2.23	0.019052076
Signaling by Interleukins	4.26	3.31	0.019735198
ADP signalling through P2Y purinoceptor 1	1.42	12.18	0.021820172
Adaptive Immune System	7.80	2.19	0.021971301
NADPH regeneration	0.71	42.17	0.023507836
Activated TLR4 signalling	3.55	3.70	0.02385979
IL6-mediated signaling events	2.84	4.59	0.023897925

La inducción de genes relacionados al estrés de RE fue analizada a distintos tiempos de interacción por PCR en tiempo real, siguiendo la expresión de los genes “78 kDa glucose-regulated protein” Grp78 y “Homocysteine-Inducible, Endoplasmic Reticulum Stress-Inducible” HERPUD, los cuales son marcadores reconocidos de esta respuesta [208]. Como se puede ver en la Figura 44 ambos genes se inducen durante la incubación de cTXNPx si bien su cinética es un poco diferente; el pico de HERPUD es a las 5 horas post incubación mientras que Grp78 se induce por encima de control a las 8 horas.

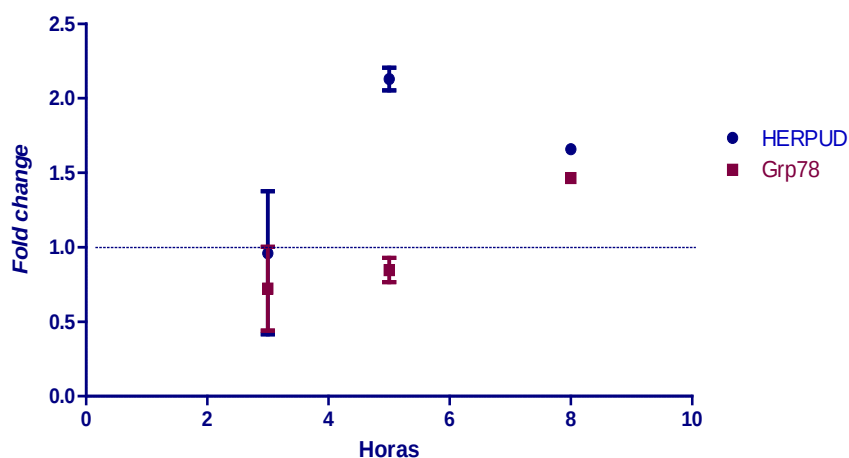


Figura 44: PCR en tiempo real de células HeLa incubadas con cTXNPx 1 μ M durante 3, 5 y 8 horas. La cuantificación de la expresión de HERPUD y GRP78 fue realizada con el método del $\Delta\Delta C_t$ en comparación al gen de referencia GAPDH

Para poder comprobar las alteraciones en el metabolismo del colesterol observadas en el transcriptoma, luego del tratamiento con cTXNPx, principalmente la inducción del receptor de LDL, decidimos evaluar la captación de LDL y la expresión del receptor de LDL por microscopía de fluorescencia. El ensayo se realizó incubando la cTXNPx durante seis horas y posteriormente la LDL fluorescente por 40 minutos adicionales. Las imágenes fueron procesadas para cuantificar la intensidad de fluorescencia media del receptor de LDL y de la LDL en el interior celular (Figura 45). El mismo ensayo se realizó con macrófagos obteniéndose resultados similares (no mostrados).

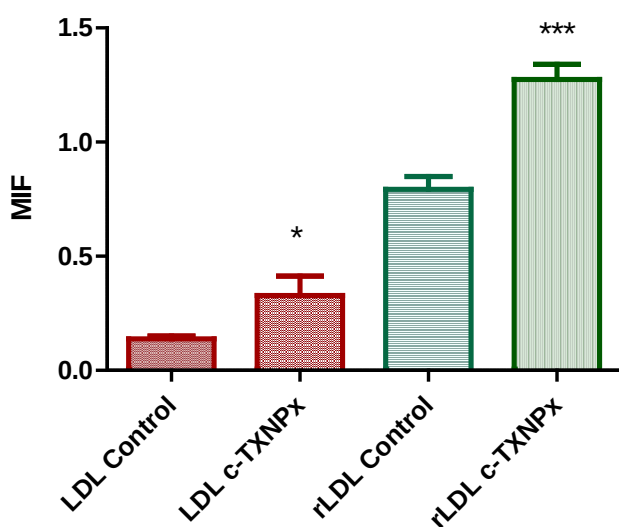


Figura 45: Cuantificación de la entrada de LDL y de la expresión del receptor LDL luego de la incubación con cTXNPx 1 μ M durante 6 horas. Se utilizó el kit LDL uptake (Cayman) y el procesamiento de imágenes se realizó utilizando el programa Icy a partir de las imágenes adquiridas en el microscopio confocal. Los asteriscos indican un valor de $p \leq 0.05$ (*) o ≤ 0.001 (***)

Como se ve en la Figura 45, existe efectivamente una inducción del receptor de LDL, en las células tratadas con cTXNPx, la cual lleva a un aumento en la incorporación de esta lipoproteína en el interior celular.

cTXNPx promueve la proliferación en células epiteliales

Además de la alteración en el metabolismo de colesterol y en el retículo endoplásmico, el transcriptoma de las células tratadas con cTXNPx reveló la presencia de varias vías relacionadas con la proliferación celular, y señalización relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Por otro lado, resultados previos de nuestro grupo y de otros grupos han mostrado la capacidad de *T. cruzi* de inducir la proliferación celular *in vitro* [154, 171, 209, 210]. Utilizamos el ensayo de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), el cual se usa como un marcador de proliferación celular [211], a pesar que realmente lo que se está evaluando es la capacidad de incorporar BrdU durante la síntesis de ADN. En este trabajo como en muchos, asumimos que un incremento en la fase de síntesis de ADN va a llevar a la división celular y por lo tanto a la proliferación.

Para ello evaluar la proliferación, las células HeLa fueron incubadas con la proteína recombinante a dos concentraciones (0,2 μ M y 1 μ M) durante dos horas y posteriormente con BrDU como se describió en materiales y métodos. Las imágenes de microscopía fueron procesadas para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de BrdU en cada núcleo celular teñido con DAPI (Figura 46).

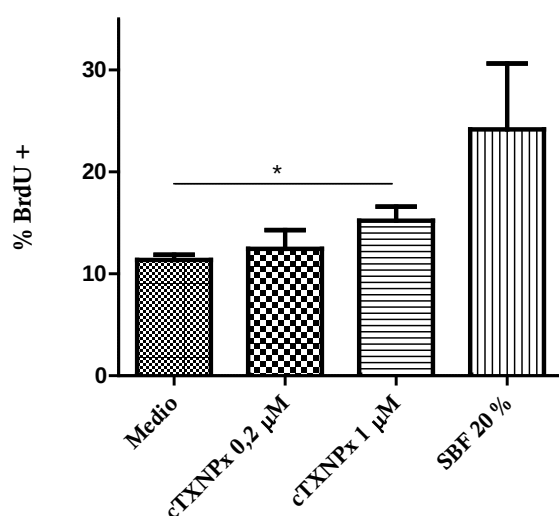


Figura 46. Cuantificación de la incorporación de BrdU en células tratadas con cTXNPx a dos concentraciones (0,2 y 1 μ M) durante 2 horas. Se graficaron los promedios de tres experimentos independientes. Como control positivo, las células fueron incubadas con SBF 20%. Los núcleos fueron teñidos con DAPI y el procesamiento de imágenes fue realizado con el programa Icy cuantificando las células BrdU positivas en relación a los núcleos DAPI positivos.

Como se puede observar, existe un aumento del 30 % aproximadamente de incorporación de BrdU en células tratadas con cTXNPx respecto al control, utilizando la concentración de más alta de proteína, demostrando su efecto mitogénico en este tipo celular.

La inducción de la proliferación requiere de una transducción de señales intracelulares la cual puede estar mediada por diferentes moléculas y diferentes receptores. Una de las más importantes es la activación de la cascada de las MAP quinasas (MAPK) mediada por ERK1/2 (MAPK3 y MAPK1 respectivamente). Para poder determinar el rol de ERK1/2 en la señalización mediada por cTXNPx, realizamos extractos de células HeLa incubadas con cTXNPx a diferentes tiempos (5, 15, 30, 60 y 120 min) y evaluamos la activación de ERK1/2 mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce la forma fosforilada. Para descartar una posible contaminación de la proteína recombinante, se utilizó LPS puro y como control negativo células incubadas solo con medio de cultivo. La Figura 47 muestra los resultados obtenidos, donde se ve claramente una activación rápida de ERK a los 5 minutos de interacción con cTXNPx, la cual desaparece luego de 15 minutos. Por otro lado, el LPS no fue capaz de disparar la fosforilación de ERK a la concentración y tiempos utilizados, mostrando que la activación observada es específica de cTXNPx. Esta falta de activación es esperada, ya que si bien las células HeLa expresan TLR4, no expresan MD2 (una molécula auxiliar) por lo que no responden al LPS puro [212].

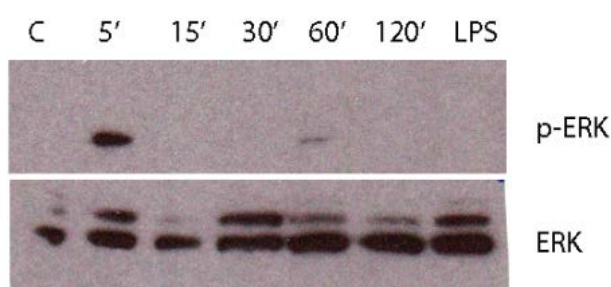


Figura 47: Activación de ERK mediada por c-TXNPx. Las células HeLa fueron incubadas con cTXNPx 1 μ M durante 5, 15, 30, 60 y 120 minutos y con LPS 1 μ g/mL por 30 minutos. Se realizaron extractos proteicos los cuales fueron analizados por Western blot usando un anticuerpo anti fosfo ERK (1/2000) o anti ERK (1/1000)

La activación de ERK observada tras el tratamiento con cTXNPx, sugiere que la vía en la que esta participa podría ser el mecanismo responsable de la inducción de síntesis de ADN (proliferación) observada previamente (Figura 46). Para seguir profundizando el estudio de las vías activadas por cTXNPx en nuestro modelo de célula epitelial, nos preguntamos si había una activación del factor de

transcripción NF- κ B el cual cumple un rol fundamental en procesos tales como la inflamación y proliferación. La activación de NF- κ B mediada por peroxirredoxinas se ha demostrado en un modelo de macrófagos murinos utilizando la Prx1 humana. En este modelo se demostró también que la activación de NF- κ B es disparada por la unión de Prx1 al receptor TLR4 y que es independiente de la actividad enzimática de la proteína [206].

Realizamos diferentes abordajes para estudiar la activación de NF κ B: por un lado estudiamos la degradación del inhibidor de NF- κ B denominado I κ B, por otro lado, evaluamos la fosforilación de p65 mediante Western blot y la translocación de NF- κ B al núcleo por IFI y finalmente realizamos ensayos de gen reportero con luciferasa. No pudimos detectar la activación de la vía clásica de NF- κ B por ninguno de los abordajes utilizados.

Como ejemplo se muestra el experimento en el que utilizamos el gen reportero luciferasa fusionado al promotor de NF- κ B, donde se muestra la activación con el control positivo PMA [213], mientras que no se detectó actividad luciferasa en células tratadas con cTXNPx (Figura 48).

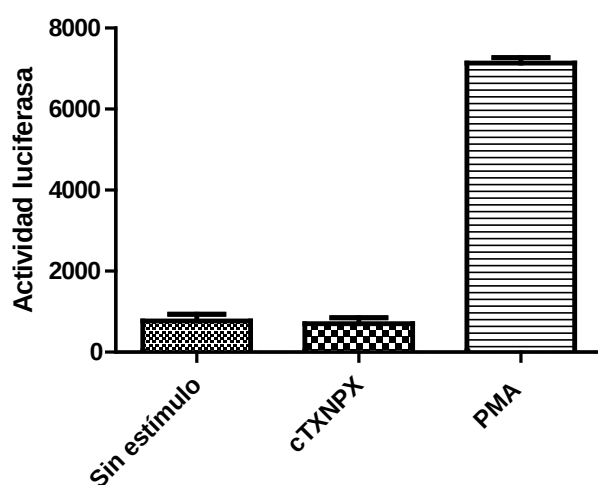


Figura 48: Actividad luciferasa medida en células transfectadas con el plásmido PRD2 (reportero para NF- κ B) y estimuladas con PMA (100 ng/mL), con cTXNPx (1 μ M) o con medio de cultivo durante 7 hs.

Tomando en conjunto estos resultados, podemos concluir que cTXNPx induce la activación de ERK pero no la activación de NF- κ B en los tiempos analizados. La activación de ERK podría estar relacionada con el efecto mitogénico de la proteína así como de la activación de AP-1 (como sugiere el resultado de RNAseq).

cTXNPx aumenta la susceptibilidad a la infección por *Trypanosoma cruzi*

Debido a que muchas vías de señalización se activan en las células epiteliales tratadas con cTXNPx y a que la proteína es secretada al exterior celular en el estadio infectivo, nos preguntamos si la preincubación de células con cTXNPx era capaz de alterar la capacidad infectiva de los parásitos. Para ello realizamos dos abordajes diferentes, en el primero preincubamos a los tripomastigotas con cTXNPx durante dos horas y luego infectamos las células epiteliales, en el segundo experimento, preincubamos dos horas las células con cTXNPx para luego infectarlas con tripomastigotas.

La preincubación de los tripomastigotas con la proteína recombinante no mostró un efecto en la infectividad (resultados no mostrados), sin embargo sí pudimos observar un aumento de la susceptibilidad celular a la infección cuando las células HeLa fueron preincubadas con la proteína (Figura 49). Evaluamos dos parámetros diferentes: el primero es la capacidad invasiva del parásito, la cual se refleja en el porcentaje de células infectadas luego de la interacción, el segundo parámetro que es la infectividad, contempla la replicación intracelular del parásito y se expresa en amastigotas por célula infectada. Como vemos en la Figura 49, el pretratamiento de las células con cTXNPx, incrementa la infectividad sin alterar la capacidad de invasión del parásito.

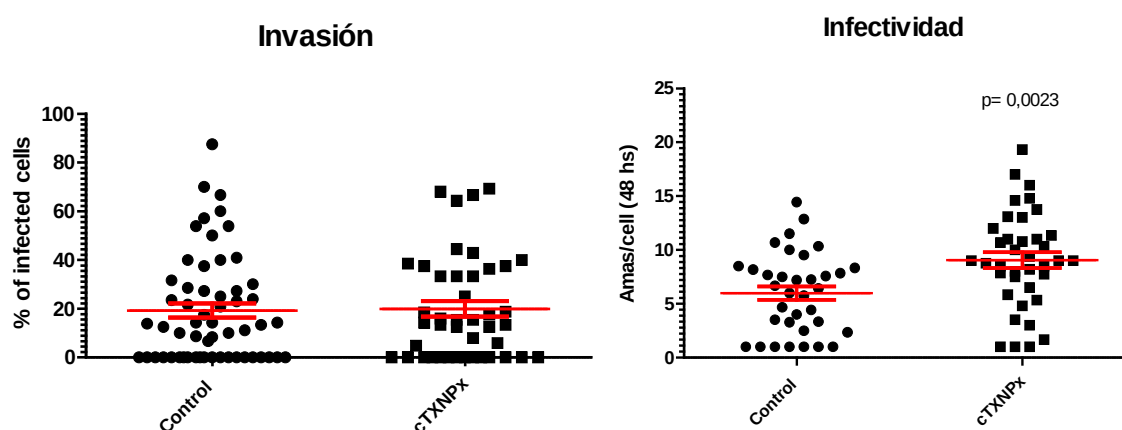


Figura 49: Evaluación de la capacidad invasiva e infectiva de tripomastigotas a células HeLa pre incubadas con cTXNPx (1μM) o con medio de cultivo durante 2 horas. Posteriormente, las células fueron infectadas con tripomastigotas de *T. cruzi* durante 4 horas, para la evaluación por microscopía del porcentaje de células infectadas (invasión) y la cantidad de amastigotas por célula (infectividad). La cuantificación se realizó con el programa Icy, cuantificando los núcleos del parásito y los de la célula hospedera. Se muestran los resultados representativos de un experimento de los 3 realizados.

Efecto de cTXNPx en macrófagos

Para poder evaluar el efecto de cTXNPx en células fagocíticas profesionales, estudiamos la interacción de la proteína con macrófagos de ratón. Para ello trabajamos con dos modelos diferentes; macrófagos peritoneales murinos y una línea celular (J774).

En primer lugar, evaluamos la producción de citoquinas en células tratadas con cTXNPx tanto a nivel de ARN mensajero por PCR en tiempo real como a nivel de secreción de citoquinas por ELISA. En algunos casos, se comparó la capacidad activadora de la proteína recombinante salvaje y la proteína mutante cTXNPxC52S. Es importante resaltar en este punto la gran susceptibilidad de los macrófagos a la estimulación con LPS (la cual es mayor que en células epiteliales), La cual probablemente es debida a la mayor expresión de receptores TLR4). Es por ello que en esta parte realizamos diferentes controles de manera de determinar la especificidad de la respuesta a cTXNPx. Como control de contaminación con LPS, se purificaron en paralelo las bacterias transformadas con el plásmido pQE30cTXNP y bacterias con el plásmido sin inserto (control *Mock*). En algunos casos utilizamos también la polimixina B, antibiótico que muestra una alta afinidad y especificidad por el LPS.

En primer lugar, estimulamos macrófagos peritoneales murinos con cTXNPx salvaje y cTXNPx C52S, así como con los controles, para luego evaluar la inducción de genes que codifican diferentes citoquinas utilizando PCR en tiempo real (Figura 50).

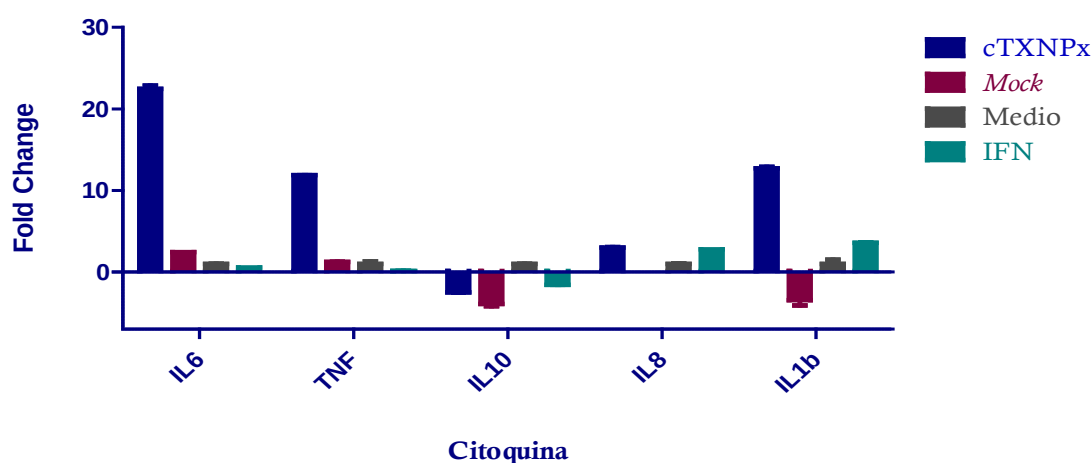


Figura 50: PCR en tiempo real de macrófagos peritoneales estimulados con cTXNPx (30 µg/mL), control *Mock* (igual volumen que cTXNPx), células incubadas con medio de cultivo y por último sobrenadantes ricos en IFN γ. La expresión de cada gen fue calculada con el método de $\Delta\Delta C_t$ en comparación al gen de referencia actina.

La Figura 50 muestra la fuerte inducción de IL6, TNF e IL1b (entre 10 y 20 veces) con respecto a los controles utilizados (medio y *Mock*), en macrófagos tratados con cTXNPx. Estas citoquinas son proinflamatorias y contribuyen al fenotipo de macrófagos clásicamente activados. La IL8 por otro lado, mostró una inducción moderada en las células tratadas con cTXNPx (tres veces), mientras que IL10 disminuyó su expresión frente al tratamiento con la proteína recombinante en comparación con el control. Es importante destacar el rol de la IL10 como citoquina antiinflamatoria o moduladora de la activación clásica de los macrófagos. Los resultados indican que cTXNPx podría tener un efecto proinflamatorio en macrófagos murinos. El efecto también fue evaluado por ELISA, determinando la secreción de citoquinas al sobrenadante de cultivo como se muestra en la Figura 51. En este ensayo también incorporamos cTXNPxC52S para evaluar la dependencia de la actividad enzimática y/o la estructura en la inducción de citoquinas.

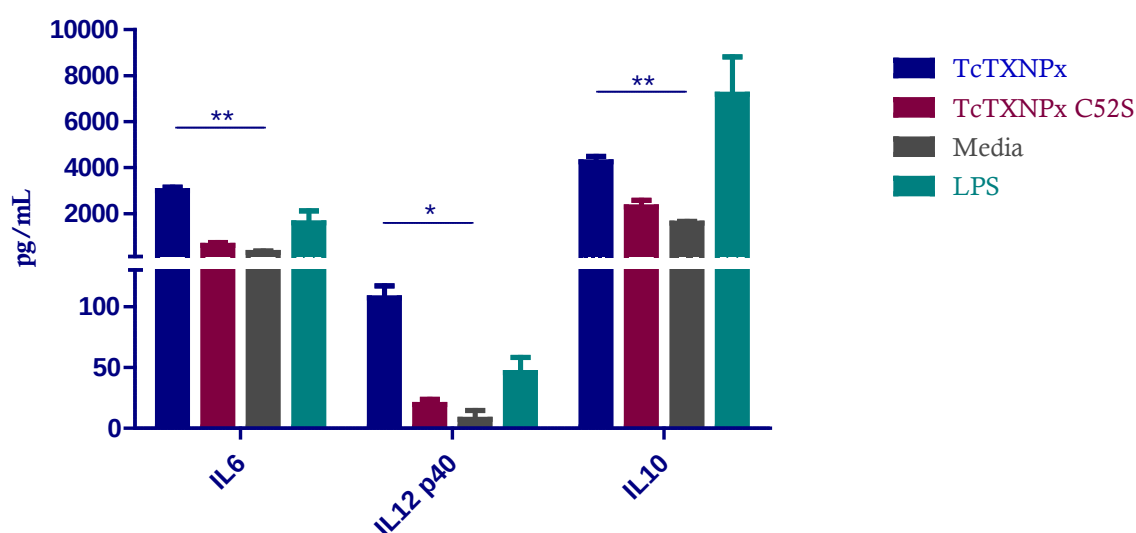


Figura 51: ELISA de sobrenadantes obtenidos de macrófagos peritoneales estimulados in vitro con cTXNPx y cTXNPxC52S (30 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) y células incubadas con medio de cultivo durante 18 horas. Los asteriscos indican las muestras que son diferentes al medio con un valor de $p \leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**) y $\leq 0,001$ (***)

Como se ve en la Figura 51 la incubación de los macrófagos con cTXNPx induce la secreción tanto de IL6 e IL12 como de IL10, este efecto no se observó con la proteína mutante para el sitio catalítico. Si comparamos la inducción de citoquinas proinflamatorias, vemos que el tratamiento con cTXNPx induce la secreción de IL6 (aumento de aproximadamente 9 veces respecto al control) y la de IL12p40 (aumento de casi 15 veces en comparación con las células control). Sin embargo, el aumento en la secreción de IL10 es modesto; solamente hay un incremento de 2,5 veces (células tratadas en comparación con el control).

Estos números sugieren que frente al tratamiento de macrófagos con cTXNPx predomina la secreción de citoquinas proinflamatorias. Este efecto de inducción es considerablemente menor frente al tratamiento con cTXNPxC52S, donde solo se observa un incremento de 2, 2,7 y 1,4 veces en la secreción de IL6, IL12p40 e IL10 respectivamente. Esto indicaría que la activación de los macrófagos sería causada principalmente por la forma salvaje y activa de la enzima, pero no por la mutante. Para poder complementar el estudio de la respuesta de macrófagos a cTXNPx utilizamos una línea celular (J774) de manera de tener condiciones experimentales más homogéneas y controladas. Estudiamos el perfil de expresión de distintos genes vinculados a la activación clásica o alternativa de los macrófagos (también conocida como M1 y M2) a nivel de ARNm. La Figura 52 muestra los resultados obtenidos luego de seis horas de interacción, mediante el análisis de PCR cuantitativo y utilizando una concentración de LPS comparable a la máxima contaminación posible que estimamos en nuestra muestra.

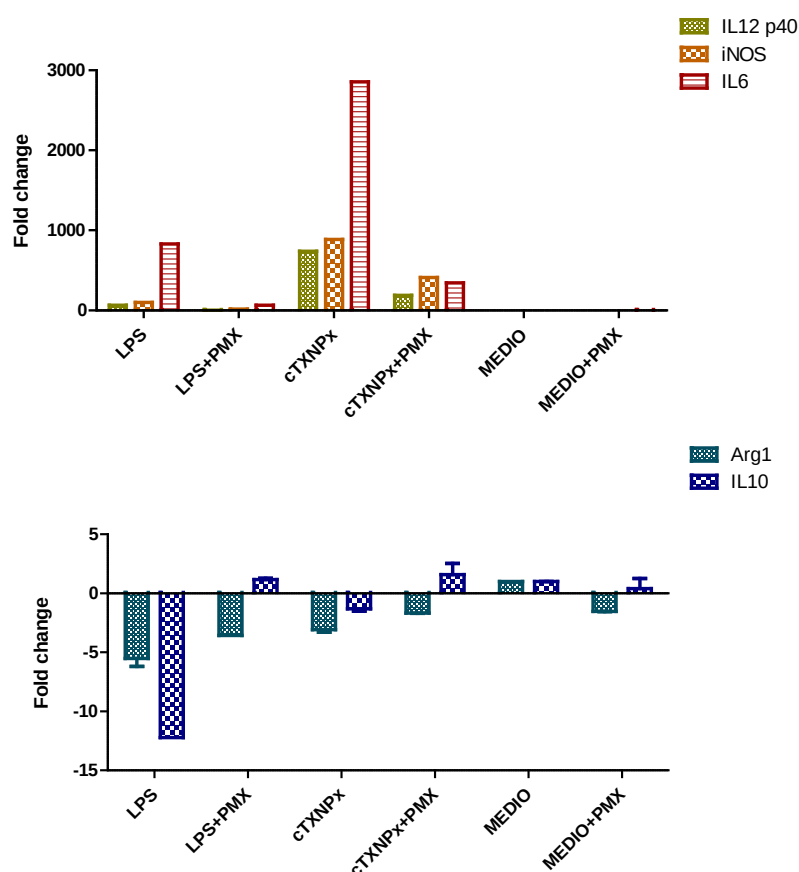


Figura 52: Análisis por PCR en tiempo real de la expresión de IL12p40, iNOS, IL6, Arginasa (Arg1) e IL10 en macrófagos J774 incubados con LPS 10 ng/mL, cTXNPx 30 µg/mL, medio, y las mismas condiciones preincubadas 30 minutos a 37°C con polimixina B (PMX) (5 µg/mL). Se muestra el cambio de expresión del gen de interés en relación al gen de actina. El cambio de expresión fue calculado con el método de $\Delta\Delta Ct$.

Estos resultados nos permiten observar que el efecto del LPS es inhibido entre 85 y 95 % por la polimixina B (aunque no a nivel de la arginasa 1), esta inhibición fue menor para el caso de cTXNPx principalmente para la IL12p40 y más notoriamente para la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible, la cual se inhibió 50 % con la polimixina B. Esto indica que si bien parte del efecto observado frente a la incubación de macrófagos con cTXNPx puede ser debido al LPS, existe una respuesta que es específica de la proteína en estudio. Evaluamos la secreción de IL6 en macrófagos J774 luego de la estimulación con cTXNPx, con cTXNPx pretratada con polimixina B, con anticuerpos anti cTXNPx o control IgG, y con LPS o LPS pretratado con polimixina B. Los resultados muestran que hay una reducción en la secreción de IL6 durante la preincubación de polimixina B tanto de la proteína como del LPS, sin embargo, la inhibición es mayor para el caso del LPS puro. Por otro lado, si bien el tratamiento con anticuerpo anti cTXNPx bloqueó en parte el efecto de la proteína, esto no fue específico, ya que la incubación con un anticuerpo control produjo el mismo efecto (Figura 53).

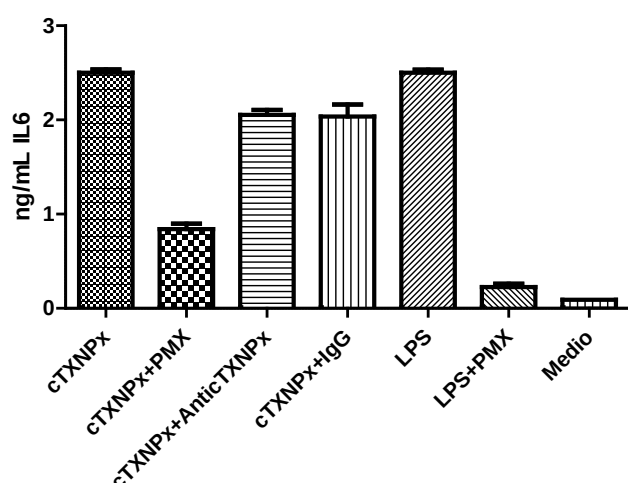


Figura 53: ELISA de sobrenadantes obtenidos de macrófagos J774 estimulados *in vitro* con cTXNPx (30 µg/mL), LPS (100 ng/mL). Tanto el LPS como cTXNPx fueron preincubados por 30 minutos con polimixina B 5 µg/mL (PMX). Adicionalmente, cTXNPx fue preincubada con anti cTXNPx y células incubadas con medio de cultivo durante 18 horas.

Estudio de la respuesta de ratones a cTXNPx administrada intraperitonealmente

Con el objetivo de estudiar la respuesta a cTXNPx en ratones, y así confirmar que la proteína es capaz de activar al sistema inmune innato y de ser endocitada, procesada y presentada al sistema inmune *in vivo*, realizamos experimentos con ratones BALB/c a los cuales se les administró la proteína recombinante mediante inyecciones intraperitoneales. Para generar una respuesta prolongada en el tiempo, se realizaron 6 inyecciones en los días 1, 3, 5, 7, 9 y 11. Luego de dos días de la última inyección, los animales fueron sacrificados para analizar la producción de anticuerpos contra la proteína, la respuesta de las células T y el

fenotipo de los macrófagos intraperitoneales. Es importante resaltar que las proteínas fueron administradas en PBS sin ningún tipo de adyuvante. En la Tabla 8 se muestra un resumen de los distintos grupos de animales y las inmunizaciones correspondientes. Este experimento se realizó dos veces con resultados similares, se muestran datos obtenidos en uno de los dos *sets* de experimentos.

Tabla 8: Esquema de grupo de animales utilizados para los ensayos *in vivo* con ratones BALB/c

	Proteína	N° de animales	N° inyecciones
Grupo 1	cTXNPx	4	6
Grupo 2	cTXNPx C52S	4	6
Grupo 3	Mock	3	6
Grupo 4	PBS	2	6

Los macrófagos peritoneales obtenidos de animales inyectados en los distintos grupos fueron analizados por PCR en tiempo real y también por ELISA para evaluar los fenotipos *in vivo* examinando la expresión de genes asociados a la activación clásica o alternativa. En la Figura 54 vemos los resultados obtenidos realizando PCR en tiempo real de los macrófagos de cada grupo de animales.

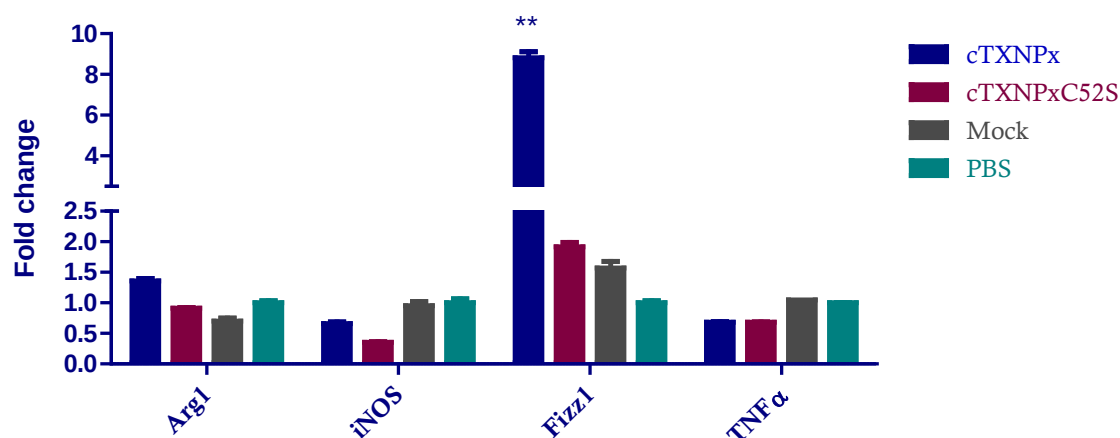


Figura 54: PCR en tiempo real de macrófagos obtenidos a partir de la cavidad peritoneal de ratones del grupo 1, 2, 3 o 4 (ver Tabla 3). Los valores de expresión están calculados con el método de $\Delta\Delta C_t$ en referencia al gen de actina. Los asteriscos indican las muestras que son diferentes al medio con un valor de $p \leq 0,01$ (**)

De la Figura 54 se desprende que los macrófagos de la cavidad peritoneal de los ratones que fueron inyectados con cTXNPx presentan un aumento en la expresión de *fizz1* y en menor medida de *arg1*.

También se puede observar una disminución de *inos* y *tnf*. Tanto *arg1* como el gen *fizz1* son marcadores de macrófagos reparadores o reguladores. Por otro lado, la expresión de iNOS y de TNF α está asociada a macrófagos activados de una manera clásica (particularmente en presencia de IFN γ), los cuales tienen potenciadas sus acciones microbicidas. Nuestros resultados *in vivo*, indican que la estimulación de cTXNPx induce un fenotipo de activación alternativo/reparador en los macrófagos peritoneales. Este fenotipo es observado al inyectar la proteína salvaje, mientras que el efecto de la proteína cTXNPxC52S es de magnitud menor.

Además de estudiar el efecto *in vivo* de la proteína sobre las células de la cavidad peritoneal, también analizamos el efecto sobre los esplenocitos de los ratones. Con el objetivo de determinar la respuesta inmune celular y en particular la polarización de linfocitos T cooperadores en respuesta a la proteína, evaluamos por ELISA la producción de IFN γ , IL10 e IL4 por esplenocitos de cada grupo de ratones, luego de ser estimulados *in vitro* con las proteínas recombinantes o con concanavalina A como control positivo (que funciona como un activador inespecífico de células T [214]) (Figura 55).

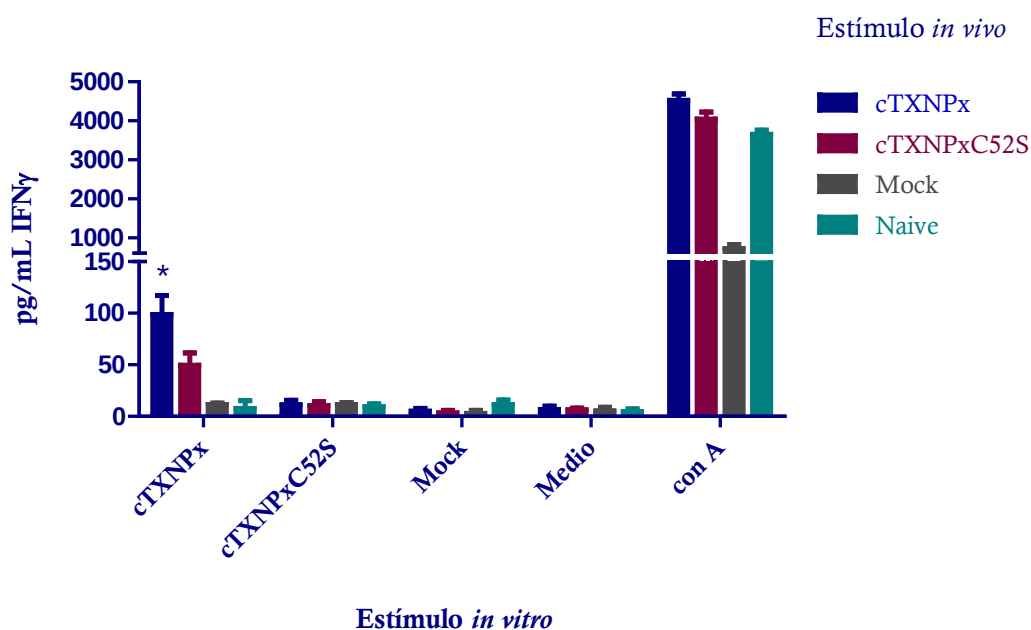


Figura 55: Elisa de esplenocitos derivados de los distintos grupos de ratones (Tabla 3), estimulados *in vitro* con 10 μ g/mL de cTXNPx, y cTXNPx C52S, Mock (mismo volumen que cTXNPx), medio y concanavalina A por 72 horas. Los asteriscos indican las muestras que son diferentes al medio con un valor de $p \leq 0,05$ (*).

La figura 55 solamente muestra los resultados obtenidos para la secreción de IFN γ ya que no se pudo detectar la presencia de IL4 ni de IL10 tras los estímulos específicos (pero si con la con A). La producción

de IFN está asociada a una diferenciación de linfocitos T hacia el fenotipo Th1. Estas células son responsables de la activación de los fagocitos y juegan un rol importante en la defensa contra patógenos intracelulares [215, 216]. Debido a que la secreción de IFN γ (pero no la de IL10 e IL4), nuestros resultados sugieren que la respuesta celular contra la proteína sería del tipo Th1.

Evaluamos finalmente la respuesta humoral generada contra las distintas proteínas mediante ELISA. Para ello, realizamos diluciones seriadas de los sueros de los ratones de cada grupo y examinamos la reactividad contra cTXNPx. Como se ve en la Figura 56, tanto los animales inyectados con cTXNPx como con cTXNPxC52S generaron una respuesta humoral específica para ambas proteínas

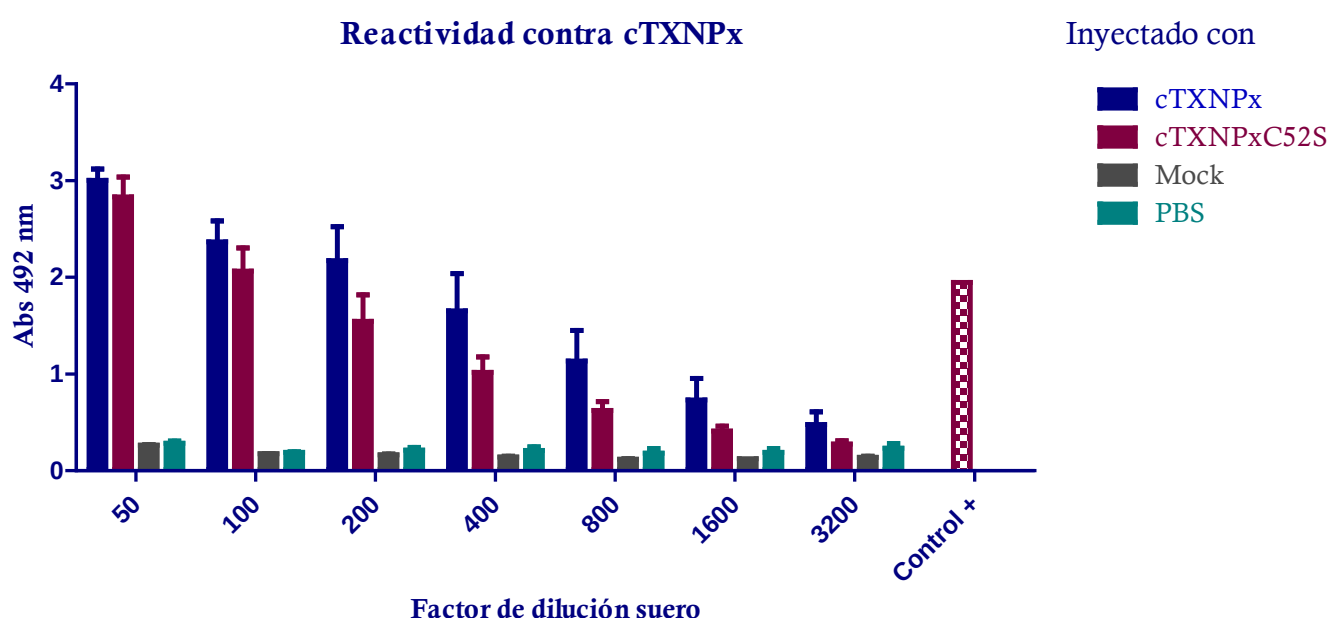


Figura 56: Elisa directo con los sueros obtenidos de los ratones inyectados. Se sensibilizó con cTXNPx 5 μ g/mL y los sueros fueron incubados a diluciones crecientes. Como control positivo se utilizó en antisero de conejos contra cTXNPx a una dilución de 1/6000.

Por último realizamos ELISA con sueros de pacientes chagásicos los cuales presentaban distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad, con el objetivo de evaluar si los sueros eran capaces de reconocer a cTXNPx. Estas muestras fueron obtenidas de pacientes, con su consentimiento, bajo el protocolo de ética aprobado por el Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina. En la Figura 57 se muestran los resultados obtenidos utilizando una dilución de los sueros 1/400 y usando como control positivo un antisero generado en conejo a la misma dilución, también se utilizó un control negativo sin antisueros y con anticuerpo secundario.

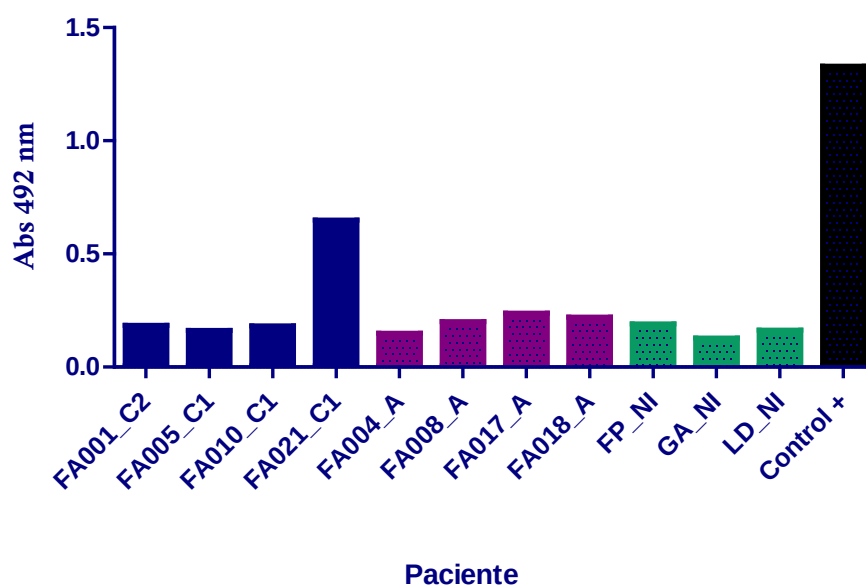


Figura 57: Reactividad contra cTXNPx de sueros de pacientes chagásicos con diferentes manifestaciones de la enfermedad. Se estudiaron pacientes con manifestaciones cardíacas de la enfermedad de Chagas (C1 y C2), asintomáticos (A) y no infectados (NI). Como control positivo se utilizó un antisuero contra la proteína generado en conejo.

Los resultados obtenidos muestran que uno de los pacientes con manifestaciones cardíacas de la enfermedad presenta un suero capaz de reconocer a cTXNPx, esto podría vincular la respuesta inflamatoria contra la proteína y la severidad de la manifestación. De todas maneras, estos son resultados muy preliminares y con un número bajo de muestras. De todas formas, encontrar reactividad en sueros humanos contra la proteína del parásito es un resultado alentador ya que sugiere que esto podría estar vinculado a la patología. Adicionalmente, la presencia de anticuerpos anti cTXNPx tal vez podría tener un valor pronóstico de la enfermedad.

H. DISCUSIÓN

En esta tesis intentamos abordar distintos aspectos de la interacción entre el parásito *Trypanosoma cruzi* y las células hospederas utilizando tres abordajes diferentes: el estudio de la respuesta de la célula a la infección, el estudio de los cambios atravesados por el parásito durante su ciclo infectivo y por último, el estudio de la comunicación célula hospedera-parásito mediada por factores secretados. Discutiremos los aspectos relacionados con los resultados principales obtenidos en este trabajo.

1- Reprogramación génica en células infectadas con *T. cruzi*

Nos enfocamos en la infección temprana por el parásito, la cual definimos como el período de hasta 6 horas post interacción. En dicho período los parásitos se encuentran adheridos, dentro de la vacuola parasitófora o recién liberados al citosol. Estudios cinéticos de escape del parásito de la vacuola en células HeLa demostraron que luego de las 8 horas post interacción el 50% de los parásitos ha egresado de la vacuola [217]. Se conoce una gran variedad de vías de señalización que se activan durante el contacto y la entrada del parásito [173, 218, 219], así que el objetivo planteado fue intentar identificar genes o vías alteradas que puedan jugar un rol esencial para la infección y que de ser bloqueadas pudieran constituir nuevos blancos de terapias antichagásicas. En este trabajo utilizamos el modelo de célula epitelial por diferentes motivos. En primer lugar, ya ha sido utilizado para el estudio de la señalización y la invasión celular por *T. cruzi* [175, 220, 221]. En segundo lugar, el epitelio constituye una barrera física que el parásito debe atravesar para poder llegar a la sangre y diseminarse a los distintos tejidos. Por último, las células epiteliales juegan un rol activo en la inmunidad, donde la IL8 secretada y la producción de óxido nítrico participan en el control inicial de la replicación así como en la respuesta inflamatoria del hospedero [222].

Nuestro análisis transcriptómico reveló que más de 1300 genes aumentaron su expresión y cerca de 400 la disminuyen durante la infección, siendo t_3 el tiempo que presentó mayor cantidad de genes diferencialmente expresados (Figura 8). Encontramos también que alrededor del 70 % de los genes inducidos, aumentan su expresión inmediatamente después del contacto y continúan sobreexpresados a lo largo de los tiempos estudiados (cerca de 950 genes). Por otro lado, los genes subexpresados que se mantienen en esa condición durante el ensayo son solo 28 (Figura 9). Muchos de los genes diferencialmente expresados son factores de transcripción; lo que podría explicar la importante reprogramación de la expresión génica durante el primer contacto con el parásito.

Estos grandes cambios transcriptómicos que podemos denominar reprogramación celular muy probablemente medien las distintas alteraciones en vías de transducción de señales, reordenamientos del citoesqueleto y activación de la vía endocítica producidas por la adhesión y/o entrada del parásito, por lo tanto no es sorprendente la cantidad de cambios observados. El análisis de vías reveló que la gran mayoría de los genes inducidos durante la infección temprana participan de procesos biológicos relacionados con la respuesta inmune (señalización por TLR, activación de NF- κ B, señalización por TNF, señalización por IFN γ , entre otras), la resistencia a estrés, la inhibición de la apoptosis, el transporte de endosomas y la comunicación intercelular. A diferencia de nuestros resultados, estudios transcriptómicos anteriores en este mismo modelo celular, mostraron una mínima modulación de la expresión génica durante la infección intermedia (tres días de infección) [149], centrada principalmente en la respuesta inmune (inducción de IL6, IL8 e IL11) y en la inhibición de proliferación celular. Se sugiere en este trabajo que el parásito induce un retraso en la proliferación celular, proceso que podría ser beneficioso para la multiplicación intracelular del parásito en el citosol de la célula infectada [149]. Las diferencias encontradas entre este trabajo y nuestros resultados podrían explicarse por los tiempos analizados; mientras que nosotros estudiamos una respuesta temprana, en el trabajo publicado por Shigihara [149] estudian una respuesta intermedia, luego de tres días de interacción parásito-célula. En este sentido, aunque tampoco son comparables completamente, el estudio de respuestas tempranas en otros modelos celulares mostró que el parásito induce grandes cambios en la expresión génica del hospedero [153, 178].

2- Respuesta de tipo inflamatoria en células epiteliales infectadas con *T. cruzi*

Dentro de los genes más sobreexpresados (cambio de expresión mayor a 10 veces), una gran proporción de ellos están vinculados con la respuesta inmune y con la resistencia a la apoptosis (Tabla 1). El análisis de vías alteradas (utilizando el software Genespring 12.0 GX como se describe en materiales y métodos) a los distintos tiempos estudiados t_0 , t_3 y t_6 mostró también una importante participación de vías clasificadas como de respuesta inmune, así como vías relacionadas con la proliferación y diferenciación, respuesta a estrés celular y transducción de señales (Figura 8A). Al comparar los procesos enriquecidos específicamente durante cada tiempo, vemos que tanto en t_0 como en t_3 existen genes que participan en vías inflamatorias (Figura 10B). El análisis más detallado mostró que dentro de la respuesta inmune, las vías enriquecidas eran diferentes en ambos tiempos. A t_0 cuando el parásito está en el proceso de adhesión, las vías enriquecidas son: activación de receptor TLR, señalización por TNF α , activación de vía NF- κ B. La respuesta inicial observada probablemente sea consecuencia del contacto de moléculas del parásito reconocidas como PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) con receptores de las células hospederas (TLR y NOD), las cuales llevan a una rápida activación de NF- κ B. A diferencia de lo

observado a t_0 , a t_6 encontramos un enriquecimiento casi exclusivo de respuesta a IFN tipo I (IFN α/β), considerando que a este tiempo el parásito se encuentra en el interior celular (ya sea en la vacuola parasitófora o en el citosol), la activación de esta respuesta podría estar mediada por receptores intracelulares. En este sentido, se ha demostrado que la inducción de IFN β puede ser inducida por reconocimiento de los receptores TLR3 y TLR4 dependientes de “TIR domain containing adapter inducing interferón β ” TRIF [43]. Alternativamente, se ha descrito un mecanismo de expresión de IFN β independiente de los receptores TLR, el cual involucra un reconocimiento citoplasmático de ARN (o posiblemente de otras moléculas) mediado por las moléculas “TANK binding kinase 1” TBK1 o “Interferon Regulatory Factor 3” (IRF3) [223]. Las células HeLa presentan una deficiencia en la señalización por TLR4 [212], y no se han identificado ligandos ni evidencia de la activación de TLR3 inducida por *T. cruzi*. Por otro lado, la inducción de IFN α ocurre cuando el parásito alcanza el citosol de la célula hospedera, esto sugeriría una activación independiente de TLR y dependiente de receptores intracelulares y moléculas aún no identificadas del parásito.

Dentro de la respuesta inflamatoria, en este trabajo nos enfocamos en la IL8 ya que es una de las citoquinas que más se inducen luego de la infección y al rol de esta molécula en distintos procesos relevantes para la infección. Se ha demostrado que la IL8 es una quimioquina que participa en la quimiotaxis de neutrófilos, promueve la angiogénesis, participa en la inhibición de la apoptosis y en la producción de metaloproteasas de la matriz [224]. Todas estas características son potencialmente favorables para la diseminación, invasión y sobrevivencia de *T. cruzi*.

Nuestros resultados mostraron que durante la infección temprana se induce 300 veces el ARNm de IL8 (Tabla 1), esta inducción fue cuantificada por PCR en tiempo real, donde se observó un cambio de expresión o *fold change* de 150 (ver nuestra publicación [171]). También evaluamos la secreción de IL8 en sobrenadantes de células epiteliales infectadas, y observamos una acumulación de esta citoquina, alcanzando niveles tan altos como 10 ng/mL. Vimos por otro lado que la inducción de esta citoquina no es específica de las células epiteliales, ya que los fibroblastos infectados también liberan IL8 al medio de cultivo, indicando que podrían participar también en la respuesta inmune inicial. Analizamos también los mecanismos responsables de la rápida inducción de IL8 utilizando ensayos con genes reporteros, donde pudimos observar que el aumento en la expresión de IL8 es dependiente de NF- κ B principalmente, aunque también existe una contribución del factor de transcripción NF-IL6 (CEBPB) (Figura 12).

Este factor de transcripción es drásticamente inducido por citoquinas proinflamatorias (como IL6, TNF e IL1 [225]) y participa tanto en la inflamación como en la adipogénesis, por lo que podría estar relacionado

con las alteraciones en el metabolismo lipídico observadas durante la infección, como se verá más adelante [226]. La activación de NF- κ B fue evidenciada por la expresión de distintos miembros de la familia NF- κ B (Figura 13), los cuales están relacionados principalmente con la activación de la vía no canónica de NF- κ B. Además de ello, detectamos también la sobreexpresión de distintos genes regulados por este factor de transcripción (anexo 1). Por último, detectamos también evidencia de la activación de la vía clásica de NF- κ B mediante el análisis de la translocación al núcleo de p65 en células infectadas (Figura 14). El factor de transcripción NF-IL6 o CEBP β tiene sitios de reconocimiento en el promotor de muchas citoquinas como la IL6, IL8, IL1, TNF entre otras y mostró ser necesario para una eficiente respuesta en macrófagos contra bacterias intracelulares [227], además de una sinergia con NF- κ B para una respuesta inflamatoria [228, 229]. La inducción de IL8 es importante en el contexto de la infección ya que esta quimioquina es capaz de atraer neutrófilos [224].

Estas células fagocíticas podrían ser usadas por el parásito a modo de caballos de Troya para diseminarse en el hospedero, proceso que se ha observado en la infección por *Leishmania sp.* y otros patógenos intracelulares, los cuales debido a mecanismos de resistencia del parásito (en el caso de *Leishmania* mediante un bloqueo del estallido respiratorio) son fagocitados por neutrófilos pero no son eliminados [230]. En el caso citado, los neutrófilos infectados son luego fagocitados por macrófagos, el hospedero natural de *Leishmania*, lo cual permite la replicación del parásito [230].

En fibroblastos infectados por dos cepas diferentes de *T. cruzi* (Sylvio DTUI e Y DTUII) se observó una gran diferencia en la expresión de IL8 e IL32 en respuesta a la infección. Los fibroblastos infectados con la cepa Sylvio pero no con la cepa Y fueron capaces de inducir ambas citoquinas en las células hospederas. Los autores sugieren que debido al rol de estas citoquinas en el control de la enfermedad, esta diferencia podría contribuir a las diferentes manifestaciones de la enfermedad producidas por ambas cepas [231].

De nuestros resultados así como de reportes previos se puede concluir que *T. cruzi* es capaz de activar NF- κ B por vías no canónica y canónica (Figuras 13 y 14) y [232]. Según se ha reportado, esta activación dependería principalmente de la estimulación de los receptores TLR4, TLR2 y TLR9 [232, 233]. La activación de dicha vía está relacionada con la capacidad de la célula de controlar la replicación del parásito, mediante la inducción de iNOS y de óxido nítrico. Tanto células epiteliales, como células endoteliales y fibroblastos son capaces de activar la cascada de señalización mediada por NF- κ B durante la respuesta a *T. cruzi*, sin embargo en miocitos se demostró una falla de su activación durante la interacción con parásitos, lo cual podría explicar al menos en parte, la presencia de los parásitos en el músculo durante la fase crónica de la enfermedad [232].

3- Inducción del daño en el ADN y resistencia a la apoptosis durante la infección por *T. cruzi*

Además de la activación de NF- κ B mediada por estímulos extracelulares, esta vía puede estimularse endógenamente por estrés celular y/o por daño en el ADN. Durante el estrés genotóxico, en particular por cortes en la doble hélice de ADN (DSB), se activa la quinasa ATM, la cual fosforila a la proteína NEMO (modulador esencial de NF- κ B) y promueve su ubiquitinación. El complejo ATM/NEMO ubiquitinado es exportado al citoplasma donde se une a la quinasa de I κ B (IKK), promoviendo la activación de NF- κ B. [188, 234]. En este trabajo evidenciamos el daño en el ADN generado durante la infección. Por un lado detectamos la presencia de la variante de histona H2AX fosforilada en células infectadas mediante Western blot (Figura 17) y por otro lado, observamos la inducción de genes involucrados en la vía DDR. Dentro de los genes involucrados en la DDR encontramos varios genes con expresión diferencial que participan en la reparación del daño y en el control del ciclo celular (Figura 16), principalmente *RECQL*, *SMUG1*, *CDKN2B* (p15) y *CDKN1A* (p21).

La activación de NF- κ B inducida por daño en el ADN ha sido la principal inductora de la secreción de IL8 durante la infección por citomegalovirus [1]. Esto nos llevó a preguntarnos si en nuestro modelo, la inducción de IL8 observada en la infección de *T. cruzi* era causada por estrés oxidativo y el daño genotóxico causado por la infección. Con este objetivo, utilizamos fibroblastos salvajes o fibroblastos ATM $-/-$ control e infectados con *T. cruzi* y evaluamos la producción de IL8 por ELISA (Figura 18). Debido a que no encontramos una disminución de la producción de IL8 en los fibroblastos ATM $-/-$, podemos inferir que la activación de IL8 es causada por estímulos exógenos mediante el reconocimiento por receptores TLR u otros receptores inflamatorios y no causada por estrés celular o genotóxico.

Tanto el estrés oxidativo, como el daño en el ADN y la inflamación son estímulos potenciales capaces de disparar la muerte celular programada o apoptosis [235-237]. Debido a que encontramos genes relacionados con TNF, así como genes de respuesta a estrés oxidativo y de DDR, decidimos estudiar los cambios de expresión de genes que participan en la apoptosis durante la infección. Pudimos observar una importante inducción de genes cuya función es la inhibición de la muerte celular programada (Figura 15) mediada por la inducción de genes como *BCL2*, *BCL2A1* y *MCL1* que codifican proteínas inhibidoras de la activación intrínseca de la apoptosis así como *BIRC2* y *BIRC3* que inhiben la inducción extrínseca de la muerte (Figura 15).

Junto con la resistencia a la apoptosis, nuestros resultados sugieren que existe una modulación de la proliferación celular durante la infección (Figura 10), la cual puede estar relacionada con la importante inducción de genes que codifican factores de crecimiento (Tabla 2), y el factor de transcripción AP-1. Sin

embargo, genes que suprimen la progresión del ciclo celular bajo condiciones de estrés también se encuentran inducidos como p21 y p15 (Figura 16). La modulación del ciclo celular y de la proliferación en células infectadas por *T. cruzi* ha sido demostrada tanto en cardiomiocitos [148], como en fibroblastos [32, 178]. En fibroblastos se demostró que las células infectadas con parásitos intracelulares presentaban un impedimento en la progresión del ciclo celular, así como la secreción de factores mitogénicos que promueven la proliferación de las células no infectadas vecinas [178]. Por otro lado, en un modelo *in vivo* se observó un aumento de la proliferación mediado por una inducción de ciclinas [151].

Debido a que en nuestro modelo contamos con un cultivo que tiene una proporción de células infectadas (30%) y no infectadas, no podemos atribuir cambios específicos en células que contienen parásitos de aquellos producidos por el microentorno (factores secretados por ejemplo). La inducción de factores de crecimiento nos demuestra que existe una estimulación de la proliferación, sin embargo posiblemente en las células infectadas que presentan daño en el ADN, probablemente el ciclo celular esté detenido (a juzgar por el aumento de p21 y p15).

La estimulación con factores de crecimiento promueven la activación de NF- κ B [238], y dicha activación es central para el crecimiento y progresión del ciclo celular en células HeLa [239].

Un aspecto importante de la vía DDR, es que su activación de manera constante asociada al estrés generado por la infección, puede llevar a la senescencia celular como un mecanismo de supresión tumoral [240]. Las células senescentes presentan una inhibición en la proliferación, una resistencia aumentada a la apoptosis y una importante reprogramación génica siendo p53 y p21 genes involucrados en la inducción de senescencia [241]. En la infección por *T. cruzi* se ha visto una detención del ciclo celular en las células infectadas, así como una alteración en los genes que regulan el ciclo celular [178]. Nosotros también evidenciamos una resistencia a la apoptosis generada por la infección así como la inducción de un fenotipo inflamatorio.

Tanto la detención del ciclo celular, como el estrés oxidativo y la activación de la vía de daño en el ADN prolongado, podrían llevar a la célula a la senescencia, expresando el fenotipo secretorio asociado a senescencia (SASP) [242]. Es interesante destacar que muchos de los genes que se encuentran sobreexpresados en células epiteliales infectadas son aquellos asociados al fenotipo SASP (IL6, IL8, CSF, iNOS, PTGES, Cox-2, IGFBP2, EGF entre otros) [240]. Este fenotipo secretor lleva a la modificación del microambiente de la célula senescente, lo cual puede llevar a la proliferación y transformación maligna [240]. Sería importante en un futuro estudiar si las células infectadas presentan un fenotipo senescente *in*

vitro e *in vivo*, así como el posible rol de las células senescentes durante el desarrollo de la patología chagásica, aspectos que no han sido explorados hasta la fecha.

4- Alteración del metabolismo lipídico inducida por la infección y por cTXNPx.

Otro de los aspectos que resaltamos de la interacción *T. cruzi*-célula hospedera, son los cambios a nivel del metabolismo lipídico. Tanto frente a la infección, como durante el tratamiento de células epiteliales con cTXNPx, encontramos cambios en la expresión de transportadores y de enzimas del metabolismo del colesterol (Tabla 7, Figuras 19, 20 y 45). Demostramos también, que durante la infección temprana se produce una acumulación de gotas lipídicas. Esto sugiere que se trata de un mecanismo común de reconocimiento de patógenos o moléculas extrañas. En cuanto al metabolismo del colesterol, hemos encontrado un aumento de la expresión de dos receptores vinculados al ingreso de colesterol a la célula durante la infección temprana por *T. cruzi*: el receptor de LDL (LDLR) y el receptor de LDL oxidada (OLR1). Además de la inducción durante la infección, describimos que la interacción de cTXNPx con células epiteliales induce también la expresión de LDL así como la acumulación de LDL en el interior celular (Figura 45). También encontramos este efecto en macrófagos murinos (resultados no mostrados). Aunque los cambios en el metabolismo lipídico inducidos por la exposición a cTXNPx son similares a los que se observan durante la infección temprana, estos últimos son más profundos. En células epiteliales infectadas pudimos demostrar además de la alteración en genes que participan en el transporte de colesterol, la inducción de genes que participan en el metabolismo de fosfolípidos y de ácidos grasos por ejemplo *ELOVL7* y *ACSM5* y una subexpresión de genes que participan en el catabolismo de ácidos grasos de cadena larga como *ACSL3*. Además de los cambios de expresión de estos genes, evidenciamos la sobreexpresión a nivel de proteínas de OLR1 y PTGS2 (ciclooxigenasa 2). También evidenciamos a nivel fenotípico la acumulación de lípidos intracelulares mediante tinción con rojo Nilo (Figura 19 y 20), indicando que la alteración lipídica trasciende al nivel de los ARN mensajeros. Las acumulaciones lipídicas que detectamos durante la infección temprana son muy similares a los llamados cuerpos lipídicos LB (Lipid Bodies) o gotas lipídicas. Estos organelos se inducen durante los procesos infecciosos con distintos patógenos y juegan un rol activo en la interacción patógeno-hospedero a nivel metabólico e inmunológico [243]. La formación de LB ha sido evidenciada en células fagocíticas principalmente en modelos de infección con virus, bacterias y también parásitos intracelulares como *Leishmania*, *Plasmodium* y *T. cruzi* [244] y aunque aún no se conoce exactamente los mecanismos que llevan a su formación, el receptor TLR2 ha sido involucrado en este proceso [191].

La formación de LB no solo se restringe a células fagocíticas; también ha sido evidenciada en células epiteliales (HeLa) durante la infección con *Chlamydia trachomatis*, mostrando su relevancia en la replicación del patógeno [245]. Los LB juegan un rol activo como moduladores de las respuestas inmunes, siendo sitios activos de formación de prostaglandinas; en *T. cruzi* se demostró la relevancia de los LB en la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) así como en la replicación intracelular del parásito [246]. En modelos *in vivo* se demostró que la inhibición de la enzima PTGS2 produce una disminución en los niveles de PGE2, lo cual lleva a un mejor control de la parasitemia, reforzando el rol de la PGE2 como una molécula inmunosupresora [247].

Nuestros resultados mostraron que la infección por *T. cruzi* induce tanto la formación de gotas lipídicas como la inducción de la enzima PTGS2 en células epiteliales. Por lo tanto, estos organelos podrían tener un rol tanto en la inmunosupresión como en el metabolismo y adquisición de nutrientes por el parásito.

La inducción del LDLR durante la infección por *T. cruzi* fue demostrada previamente en fibroblastos y en cardiomiocitos [143], donde también se estudió la relevancia de este receptor en la infección del parásito [143]. Sin embargo nuestro trabajo reporta por primera vez la inducción del receptor de la LDL oxidada (OLR-1) que no había sido previamente asociado a la infección por *T. cruzi*. La inducción del gen *OLR1* ha sido previamente involucrada en la infección por *Chlamydia pneumoniae*. Por un lado, se demostró la unión de la bacteria al receptor en células endoteliales y que el receptor participa directamente en la entrada de las bacterias [248]. Por otro lado, también se demostró que la infección por esta bacteria induce la expresión del receptor OLR-1 [187]. Debido al estrecho vínculo entre la sobreexpresión del receptor OLR-1 y la mayor incidencia de aterosclerosis [249], la infección con *C. pneumoniae*, ha sido asociada al desarrollo de esta patología cardiovascular [171, 227-229].

El aumento de colesterol intracelular parece ser una característica común a procesos infecciosos, ya que se ha demostrado para infecciones causadas por virus [250, 251], bacterias [252-254] y también protozoarios [191, 255-257]. El rol que juega el colesterol en el contexto de la interacción patógeno-célula hospedera es variado. En primer lugar los microdominios enriquecidos en colesterol de la membrana, son importantes para la entrada de algunos patógenos como el virus de la hepatitis C [251], virus del HIV tipo I [258], bacterias [259], y también para *T. cruzi* [172]. El rol de los microdominios en la infección está probablemente vinculado a su asociación con proteínas como caveolína, flotilina, Shc, MAPK, protein quinasa C, PI3K, p85, que podrían participar en la invasión [260]. En este caso, la alteración en el metabolismo del colesterol podría alterar la composición de las membranas y afectar directamente los mecanismos de invasión del parásito. En segundo lugar, la acumulación de colesterol intracelular podría

servir como fuente de lípidos aprovechada por el parásito, para la síntesis de sus membranas y compuestos esteroideos. En este sentido, los epimastigotas de *T. cruzi* contienen ergosterol como principal componente de sus membranas ya que no sintetizan colesterol, sin embargo cultivados en presencia de suero, los epimastigotas también incorporan colesterol en sus membranas [261]. En amastigotas por otro lado, hasta el 80% de los esteroides de membrana son colesterol, probablemente provenientes del hospedero [262]. Nuestros resultados transcriptómicos durante el ciclo de vida del parásito indican que el metabolismo lipídico es importante en los estadios replicativos (amastigotas y epimastigotas) (anexo 2).

Un único trabajo estudia la relación entre la infección por *T. cruzi* y la aterosclerosis mostrando que ratones alimentados con una dieta rica en lípidos (dieta occidental) e infectados con *T. cruzi*, se incrementa el desarrollo de aterosclerosis en combinación con un aumento de la inflamación en la aorta [263]. A diferencia de lo que ocurre durante la infección con *C. pneumoniae*, en el caso de la infección por *T. cruzi*, no pudieron detectarse amastigotas en la zona de la aorta examinada. Esto implica que los mecanismos que llevan a esta alteración no sería causados directamente por el parásito, pero si por mediadores presentes en la infección. Nos parece que debido a los pocos antecedentes y a la relevancia tanto de las enfermedades cardiovasculares como de la cardiopatía chagásica, esta es un área que tal vez merezca mayor atención.

5- Cambios transcriptómicos en los diferentes estadios del parásito

Realizamos el transcriptoma de distintos estadios de *T. cruzi* con foco del estudio de los cambios en genes que codifican moléculas de superficie y proteínas del metabolismo del parásito, asumiendo que son procesos importantes para el ciclo infectivo del parásito.

Analizamos la expresión de genes de familias multigénicas de superficie, centrándonos en mucinas, MASP, transialidasa, gp63 principalmente, y determinamos que cada estadio presenta un perfil génico específico a pesar que la mayor inducción de genes que codifican moléculas de superficie se encontró en tripomastigotas (Figura 21). Nuestros resultados de secuenciado profundo aportan evidencia nueva acerca de la expresión de genes que pertenecen a familias multigénicas de superficie en los distintos estadios del parásito, lo cual no ha sido muy explorado hasta la fecha.

El análisis de los 500 genes más expresados reveló que 277 eran comunes a los tres estadios. Los procesos biológicos (según los términos de ontología génica) de los genes comunes están relacionados con el movimiento basado en microtúbulos (de organelos y partículas), la organización cromosómica, el empaquetamiento de ADN, la respuesta al estrés y la progresión del ciclo celular. Esto sugiere que además

del control postranscripcional, la regulación epigenética puede participar también en el control de la regulación de la expresión génica durante todo el ciclo de vida del parásito, lo cual ha sido poco explorado. Llamativamente algunas aminoacil tRNA sintetasas (glutamil, isoleucil, prolil y valil tRNA sintetasas) mostraron una alta expresión a nivel de ARNm en todos los estadios. El incremento específico en estas aminoacil tRNA sintetasas podría sugerir un rol adicional de estas enzimas durante el ciclo de vida, como se ha demostrado para alguna de ellas en otros organismos [264-266]. Además, en todos los estadios encontramos varios genes vinculados al metabolismo de proteínas, es decir traducción, plegado, degradación (Tabla 4). Estos resultados reflejarían la importancia de la regulación traduccional y postraduccional de la expresión génica en estos organismos.

El análisis de los 500 genes más expresados en todos los estadios reveló la expresión aumentada en tripomastigotas de genes vinculados con la transducción de señales, la adhesión celular y la estructura del flagelo, consistente con su capacidad infectiva. En forma similar, varios genes codificantes para quinasas, fosfatasas y proteínas de adhesión celular se encontraron altamente expresados en amastigotas. Por el contrario, en amastigotas, uno de los términos de ontología génica que aparece en el análisis de los más expresados es el de la regulación del ciclo celular y la regulación de las quinasas dependientes de ciclinas, lo que es esperable debido a que los amastigotas a diferencia de los tripomastigotas son replicativos, mientras que en epimastigotas los genes enriquecidos están relacionados con el metabolismo aeróbico (Figura 22).

Encontramos en epimastigotas una sobreexpresión de genes relacionados con metabolismo aeróbico (fosforilación oxidativa, ciclo de Krebs), así como también con la síntesis de esteroides y el metabolismo de aminoácidos (Figura 23, 24 y 26). Esto refleja que los parásitos en el estadio epimastigota son muy activos metabólicamente y que cuentan con una tasa elevada de biosíntesis de macromoléculas, probablemente debido a que es un estadio replicativo [267]. Los epimastigotas son capaces de catabolizar glucosa y aminoácidos en cultivo *in vitro*, sin embargo en el entorno biológico en el cual se encuentran, los aminoácidos (en particular la prolina y la glutamina) que son abundantes en la hemolinfa del insecto serían la fuente energética más relevante *in vivo* [267]. Adicionalmente, en epimastigotas encontramos una sobreexpresión de genes de la ruta de las pentosas fosfato (anexo 2), la sobreexpresión de esta vía podría llevar a un aumento de la producción de NADPH y de ribosa fosfato en este estadio. Se ha demostrado, que tanto la glucólisis como la ruta de las pentosas fosfato son vías muy activas en epimastigotas [268]. El NADPH es necesario para mantener una elevada síntesis de lípidos, síntesis de nucleótidos y para mantener un balance redox adecuado. El gran incremento en genes relacionado con vías metabólicas en

epimastigotas se encuentra contrarrestado por la importante reducción en la expresión de genes que codifican moléculas de superficie que participan en la adhesión en la señalización celular.

Por su parte, los ajustes metabólicos que presentan los tripomastigotas incluyen un enriquecimiento de vías de metabolismo de carbohidratos, lo cual refleja la alta disponibilidad de glucosa que presenta su entorno. El aumento de genes de enzimas de la glucólisis es consistente con la elevada incorporación de glucosa en este estadio reportada previamente [269]. En amastigotas por el contrario, se ha visto que existe una disminución en la expresión del transportador de glucosa tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína [269]. Nuestros datos transcriptómicos indican que en amastigotas existe una subexpresión de hexoquinasa (primer enzima de la vía glucolítica) así como también de las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enolasa (Fig. 25). Tanto la falta de expresión de transportadores de glucosa [269], la falta de demostración de transporte de glucosa [269], la baja concentración intracelular de glucosa libre [270] y la disminución en los niveles de mensajeros de las enzimas arriba mencionadas (Fig. 25), sugiere que este carbohidrato no es la principal fuente de energía durante este estadio. Debido a la expresión moderada de las otras enzimas glucolíticas, especulamos con que los amastigotas podrían usar alternativamente hexosas fosfato (aunque aún no se han caracterizado hasta la fecha transportadores de azúcares fosfato en *T. cruzi*), o bien aminoazúcares y convertirlos en azúcares fosfato como fuente de energía, como se ha descrito para *Leishmania major* [271]. Sin embargo, la alta expresión de permeasas y transportadores de aminoácidos en amastigotas sin embargo sugiere que los aminoácidos son el combustible principal en el estadio intracelular (Figura 26). El rol del metabolismo de aminoácidos en amastigotas también fue demostrado recientemente [32]. Nuestro trabajo tampoco descarta la utilización de ácidos grasos del hospedero, como fuente de energía, como se ha demostrado para los amastigotas de *Leishmania* [272]. Es importante destacar que tanto nuestros resultados como los publicados previamente, analizan el metabolismo energético de las formas *in vitro*, con medios de cultivo ricos en nutrientes, que no son necesariamente las condiciones fisiológicas con las que se encuentra el parásito.

Estos datos son interesantes para seguir estudiando algunas características importantes de cada estadio, pero también aportando comprensión a la regulación de la expresión génica en estos organismos. El análisis de las regiones 3' no traducidas y la expresión de distintos genes nos puede brindar pistas acerca de la regulación, pero también la correlación entre datos genómicos, transcriptómicos, traductómicos y proteómicos nos puede ayudar a generar una imagen más global de la regulación en estos organismos. Como vimos en la introducción, la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos es muy compleja y se da a distintos niveles [3]. Los principales mecanismos que participan en la regulación son la

regulación de la estabilidad del ARN mensajero [273, 274], la regulación de la traducción como se demostró recientemente [37] y también a nivel postraducciona [275].

6- Secreción de cTXNPx por epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi*

Demostramos la presencia de vesículas extracelulares en la superficie de epimastigotas y tripomastigotas durante el estrés nutricional pero también sin estrés (Figura 29). El análisis de las proteínas presentes en estas vesículas reveló por un lado, que cerca del 50 % son comunes a las encontradas en otros tripanosomátidos y que las proteínas secretadas están relacionadas entre otros, con el empaquetamiento y estructura de la cromatina, así como también con el plegamiento de proteínas (Tabla 5). El enriquecimiento de procesos vinculados a la compactación y organización de la cromatina podría sugerir que las vesículas del parásito reprograman la expresión génica de su hospedero mediante regulación epigenética, sin embargo esto no ha sido demostrado hasta la fecha.

El efecto de las vesículas de epimastigotas en la reprogramación de la expresión génica ha sido estudiado previamente, donde se encontró una alteración de genes relacionados con transducción de señales, respuesta inmune, citoesqueleto y metaloproteasas [203]. Se ha demostrado también el rol de las vesículas secretadas por *T. cruzi* en la promoción del parasitismo, modulando la respuesta inmune del hospedero en favor del parásito [276].

Dentro de todas las proteínas encontradas en las vesículas secretadas por *T. cruzi*, en esta tesis nos enfocamos en el estudio de la triparredoxina peroxidasa citosólica. Esta enzima antioxidante es un factor de virulencia para el parásito [55] y posiblemente juega un importante rol en la señalización en células hospederas. En primer lugar, demostramos que la enzima se secreta al medio de cultivo en forma libre o asociada a vesículas extracelulares en epimastigotas y en tripomastigotas (Figura 28, 30 y 31). La enzima también fue detectada por otros investigadores en el secretoma de epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos en distintas fracciones como vesículas de mayor tamaño, vesículas pequeñas y fracción libre de vesículas [87], así como en el exoproteoma de tripomastigotas derivados de células [88]. Por lo tanto existe evidencia que indica que la proteína se secreta en distintos estadios y probablemente utilizando distintos mecanismos de secreción no clásica dado que carece de péptidos señal que la dirijan a la vía secretoria convencional.

7- Interacción de cTXNPx *in vitro* con células epiteliales y macrófagos

Analizamos posteriormente la capacidad de cTXNPx de interactuar con las células hospederas tanto cuando se encuentra asociada a vesículas (Fig. 32), como cuando se halla libre de ellas, en este caso

utilizando la forma recombinante de la proteína. En el primer caso, al incubar las células durante 10 minutos con las vesículas secretadas, pudimos localizar a cTXNPx en la superficie celular. Incubaciones más largas (1 hora y 6 horas) mostraron una asociación mayor de la proteína. Los cortes ortogonales sugieren una localización intracelular de la proteína, sin embargo no sabemos si se encuentra rodeada de membrana o libre en el citoplasma celular. Además de la interacción de cTXNPx mediada por vesículas, exploramos en este trabajo la interacción directa entre cTXNPx y células de mamífero. Vimos que tanto en células epiteliales como en macrófagos la proteína libre de vesículas es capaz de adherirse e ingresar a las células (Figura 33 y 38). En células epiteliales, observamos que la interacción es dependiente de la temperatura ya que a 4°C la proteína permanece exclusivamente en la superficie, mientras que a 37°C la marca es intracelular. Demostramos también en los ensayos de interacción que no requiere de la enzima activa enzimáticamente para ingresar a las células, ya que cTXNPxC52S, la enzima con una mutación puntual que carece de actividad enzimática, también es capaz de unirse a la superficie celular (Figura 36). Al estudiar con más detalle el proceso de entrada, pudimos observar colocalización con el marcador de endosomas de reciclaje Rab11 [277]. Utilizando un microscopio de superresolución en el Lab. del Dr Wanderley de Souza y un anticuerpo que reconoce LAMP1 pudimos corroborar que cTXNPxAtto647 se localiza en lisosomas (Figura 37). Estos resultados nos permitieron concluir que la proteína es incorporada a las células y se localiza en organelos intermedios y finales de la vía endocítica. A pesar de ello, una proporción de cTXNPx permanece en la superficie celular, aún luego de cuatro horas de interacción donde colocaliza con WGA, una lectina que se une a los glicanos de la superficie celular (Figura 37). El estudio de la interacción de cTXNPx con macrófagos reveló que la proteína es capaz de ingresar a las células y localizarse en lisosomas (Figura 39), y al igual que en células epiteliales, la interacción también es dependiente de la temperatura, sin embargo en este tipo celular, la forma inactiva de la proteína mostró una menor interacción e ingreso a las células (Figura 40). A diferencia de lo observado en células HeLa, la internalización de cTXNPx es casi completa en células fagocíticas y como dijimos sí parece ser dependiente de la actividad o estructura de la misma. Si bien realizamos algunos experimentos para identificar él o los receptores de cTXNPx en las células de mamífero, los resultados no fueron exitosos. A pesar que existe evidencia que muestra que algunas peroxirredoxinas interactúan con receptores TLR4, como la Prx1 humana [133] y la peroxirredoxina de *Plasmodium berghei* PbAPrx [278], nosotros no pudimos demostrar dicha interacción hasta la fecha.

Es interesante notar que la endocitosis y procesamiento son procesos esenciales para la presentación de antígenos tanto en MHCI como MHCII por las células presentadoras de antígeno (como macrófagos y células dendríticas), lo cual es fundamental para el desarrollo de respuestas celulares y humores

específicas. Por lo tanto, nuestros resultados *in vitro* indican que cTXNPx podría ser reconocida y endocitada por macrófagos, lo cual en el contexto de señales inflamatorias adecuadas podría iniciar una respuesta inmune específica contra la proteína.

Luego de demostrar la interacción de cTXNPx, nos preguntamos cuál sería la señalización y el efecto generado en las células epiteliales por esta interacción. Al analizar la respuesta de las células epiteliales a la incubación con cTXNPx (durante seis horas), a nivel transcriptómico por RNAseq, pudimos observar un cambio de expresión en aproximadamente 500 genes, donde la mitad aumento su expresión. Un primer análisis de los componentes celulares enriquecidos en genes sobreexpresados luego del tratamiento con cTXNPx reveló la activación de la respuesta a las proteínas desplegadas en el retículo endoplásmico (“UPR”, de “Unfolded Protein Response”), el aparato de Golgi y la membrana plasmática (Fig. 42, y 43, Tabla 7). Por otro lado, el mismo análisis con los genes subexpresados mostró una participación principal del citoesqueleto celular y del citoplasma (Figura 42). Realizamos también análisis de procesos y vías biológicos inducidos durante el tratamiento con cTXNPx (Figura 43 y Tabla 7) los cuales revelaron una inducción de los siguientes procesos biológicos: regulación de la proliferación celular, respuesta inmune, metabolismo de colesterol, respuesta de proteínas mal plegadas, estrés del retículo endoplásmico y señalización por AP1.

Para poder comprobar y comprender mejor los efectos de la proteína, comenzamos por explorar el rol de cTXNPx en la modulación de la proliferación celular, mediante ensayos de incorporación de BrdU, y encontramos que la incubación con cTXNPx durante dos horas es capaz de inducir un aumento en la síntesis de ADN (Figura 46). La medida de incorporación de BrDU se utiliza frecuentemente como un marcador de proliferación, por lo tanto nuestros resultados indicaron que la proteína tiene un efecto mitogénico en células epiteliales. La proliferación celular puede ser inducida por activación de la vía de las MAPK [279], así como también por la activación de NF- κ B [239]. Dentro de la vía de las MAPK, se han demostrado al menos tres vías diferentes: la vía de “Extracelullar Signal-Regulated Kinase” ERK kinasa, la de “Jun Kinasa” (JNK) y p38 MAPK. Evaluamos en este trabajo la activación de ERK, el cual es activado por factores de crecimiento extracelulares y citoquinas y pudimos detectar la activación de esta vía luego de la interacción con cTXNPx (Figura 47). Nuestros resultados sugieren que la activación de la proliferación podría ser dependiente de la activación de ERK, sin embargo no evaluamos la activación (y por lo tanto la contribución) de las otras vías. En este modelo, no pudimos demostrar la activación de NF- κ B (Figura 48) o al menos la activación canónica de este factor de transcripción.

Por otro lado, encontramos una inducción de genes relacionados con la síntesis y transporte de colesterol frente al tratamiento con cTXNPx. Demostramos directamente la acumulación intracelular de LDL en células tratadas con cTXNPx así como un aumento en la expresión del receptor de LDL (LDLR) en células epiteliales (Figura 45), pero también en macrófagos murinos (resultados no mostrados). Debido a que el receptor de LDL es una de las moléculas que median la invasión del parásito [143], pensamos que el tratamiento con cTXNPx podría llevar a un incremento en la susceptibilidad a la infección. Efectivamente, pudimos demostrar que la interacción de la proteína con las células epiteliales, produce un aumento del número de parásitos intracelulares a pesar que el porcentaje de células infectadas no varía significativamente (Fig. 45). Especulativamente, por lo antes mencionado este efecto podría ser causado por la inducción del LDLR facilitando la entrada del parásito, pero otros mecanismos también podrían explicar este efecto. Entre ellos, pensamos que la inducción de la fase S en células HeLa mediada por cTXNPx (Figura 46 y 47) podría ser beneficioso para el ingreso del parásito, ya que se ha demostrado que *T. cruzi* infecta preferentemente células en fase S, aunque las bases moleculares de esta preferencia no han sido exploradas aún [280]. Alternativamente, los cambios en el metabolismo de colesterol podrían causar una alteración en los microdominios de membrana, lo cual podría tener un impacto directo en la invasión del parásito [172]. Pensamos que tanto la inducción de la proliferación, la activación de ERK y la alteración en el metabolismo del colesterol, son procesos estrechamente relacionados y que tienen un fuerte impacto en el proceso de infección de células epiteliales.

Junto con las alteraciones en la proliferación, metabolismo del colesterol y proliferación, encontramos también vías relacionadas a la respuesta inmune alteradas en células epiteliales tratadas con cTXNPx (Tabla 7). La inducción de IL8, IL6 e IL1A fue cuantificada mediante PCR en tiempo real (Figura 41), donde observamos una inducción de las tres citoquinas, siendo la más relevante la IL8. Como ya discutimos anteriormente, la inducción de IL8 en células epiteliales es de particular importancia debido a su capacidad quimiotáctica y angiogénica. La activación de la vía de las MAPK, en particular ERK 1/2 y p38 inducida por IL1b en células epiteliales mostró ser la responsable de la secreción de IL8, IL6 y CXCL1 [281]. Debido a que las células HeLa no presentan un receptor TLR4 funcional y a que no pudimos demostrar la activación de NF-kB en este modelo en respuesta a la proteína en estudio, proponemos que la activación de ERK es la responsable de la inducción de IL8 e IL6 en células epiteliales, lo cual podría ser demostrado utilizando inhibidores específicos de ERK. La activación de la vía de las MAPK inducida por cTXNPx podría estar involucrada en la modulación de la respuesta inmune del hospedero, ya que se ha demostrado que tanto *Leishmania* como *T. cruzi* son capaces de

interferir con las cascadas de señalización de MAPK como mecanismo de evasión de la respuesta inmune [282].

En suma, nuestros resultados indican que cTXNPx induce la expresión de citoquinas proinflamatorias, principalmente IL8 e IL6. Por otro lado, la proteína también produce una alteración en el metabolismo lipídico de células epiteliales, lo cual se traduce probablemente en estrés del retículo endoplásmico. Los efectos de cTXNPx en células epiteliales son mediados al menos en parte por la activación de ERK, e independientes de NF- κ B.

Como mencionamos previamente, entre los procesos que se encuentran más inducidos en respuesta a cTXNPx está respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (Unfolded Protein Response), la cual lleva al estrés del ER (Figuras 42, 43 y 44). La respuesta al estrés del ER puede ser desencadenada por cualquier perturbación en el funcionamiento de este organelo, entre ellos: modificación de la composición de fosfolípidos y de colesterol de las membranas celulares, producción elevada de proteínas, alteraciones del calcio, poder reductor, formación de especies reactivas del oxígeno, entre otras [283]. Evaluamos la expresión a nivel de ARNm y de proteína de dos genes relacionados con el estrés del ER (HERPUD y Grp78) durante la exposición de células epiteliales a cTXNPx y vimos que ambos se inducen levemente pero con cinéticas diferentes (Figura 44). Este resultado sugiere que la proteína induce estrés del ER, si bien no tenemos ninguna evidencia de cuál puede ser la causa del estrés del ER, podemos especular con que la alteración en el metabolismo de colesterol encontrado podría estar relacionada. Alternativamente, cTXNPx podría causar una distorsión en el estado oxidante de este organelo, afectando el plegamiento correcto de las proteínas. Sin embargo, en este caso sería necesario demostrar que la proteína tiene actividad enzimática, que se localiza en el retículo endoplásmico de la célula y que produce estrés reductor en este compartimento. Una forma de hacerlo sería demostrar la falta de inducción de estrés del RE al incubar con cTXNPxC52S.

La activación de ERK en respuesta al estrés del retículo endoplásmico es uno de los mecanismos que previenen la apoptosis celular [284], en nuestro modelo por lo tanto, la activación de ERK podría ser consecuencia de la inducción del estrés del retículo inducido por cTXNPx.

Además de cTXNPx, encontramos en la literatura otras proteínas secretadas por patógenos que modulan respuestas de las células hospederas. Entre ellas, la chaperona Hsp60 de *C. pneumoniae*, la cual es capaz de estimular la proliferación de células musculares endoteliales mediante su interacción con TLR4 y activación de ERK [285]. La activación de la vía de ERK por ambas proteínas, nos llamó la atención ya que se ha demostrado la capacidad de algunas peroxirredoxinas de funcionar como chaperonas

moleculares en determinadas condiciones. Esto ha sido observado para la peroxirredoxina humana [286], la mTXNPx de *Leishmania infantum* [287], la Prx I y II de *Plasmodium falciparum* [288], así como peroxirredoxinas de levaduras [289]. A pesar que en *T. cruzi* no se ha demostrado la actividad chaperona de la proteína, resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que podría tener esta actividad. Por otro lado, su estructura similar a las chaperonas clásicas [5] y la alta homología con las peroxirredoxinas mencionadas anteriormente, indica que cTXNPx podría cumplir un rol similar en este parásito.

En este contexto, distintas proteínas con actividad chaperona han mostrado la capacidad de activar los receptores TLR una vez que son liberadas al medio extracelular (por ejemplo frente a daño celular) actuando probablemente como DAMPS (Damage Associated Molecular Patterns) [188, 189, 222]. De la misma manera, moléculas con actividad chaperona liberadas por patógenos activan vías de señalización actuando como PAMPS [186, 290]. Esto sugiere que la estructura común de este tipo de proteínas estaría involucrada en la activación de estos receptores. El rol de las proteínas extracelulares que pueden actuar tanto como DAMPS o PAMPS podría tener una implicancia en las respuestas autoinmunes, como es el caso de la HSP60 de *Helicobacter pylori* [291]. Por lo tanto la secreción de cTXNPx, su efecto proinflamatorio tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su alta homología con las peroxirredoxinas humanas podrían tener implicancias con el desarrollo de la patología chagásica.

Mostramos que cTXNPx es internalizada por fagocitosis/endocitosis por macrófagos (colocalización con LAMP1, Figura 39). La endocitosis de partículas extraña por macrófagos y su activación son procesos relevantes para la activación del sistema inmune como ya recordamos. Para evaluar si la proteína fagocitada era capaz de activar macrófagos, y de esta forma generar respuestas adaptativas, comenzamos con un modelo sencillo *in vitro*, trabajando con macrófagos peritoneales de ratón. Realizamos diferentes controles de manera de considerar el posible efecto por moléculas contaminantes provenientes de las bacterias como el LPS, que se conoce que es un potente agonista del receptor TLR4 [292]. La activación de los macrófagos *in vitro* fue evaluada por PCR cuantitativa en transcripción reversa donde se observó una inducción cercana a 10 veces de IL1b, TNF e IL6 (Figura 50) con respecto al control (células estimuladas con medio de cultivo). A diferencia de lo ocurrido con células epiteliales, la inducción de IL8 fue muy pequeña en macrófagos peritoneales (cerca de 3 veces) y no encontramos diferencias en los niveles de IL10 en células tratadas con la proteína y con el mock.

La inducción de genes proinflamatorios como IL1b, TNF e IL6, sugerirían una activación clásica de los macrófagos *in vitro*. El perfil de activación de los macrófagos también fue evaluado por ELISA, donde evaluamos la secreción de citoquinas proinflamatorias IL12p40 e IL6 e IL10 (antiinflamatoria) en

sobrenadantes de macrófagos peritoneales en respuesta a cTXNPx o a la mutante inactiva cTXNPxC52S (Figura 51). Encontramos que el tratamiento con cTXNPx pero no con cTXNPxC52S induce la secreción de las tres citoquinas al medio de cultivo. En concordancia con los resultados obtenidos por PCR cuantitativa, el análisis del balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias reflejó una predominancia de citoquinas proinflamatorias (IL6 e IL12p40) frente al estímulo con cTXNPx. La menor inducción inflamatoria con cTXNPxC52S con respecto a cTXNPx fue llamativa, debido a que la única diferencia en la estructura primaria que poseen es una sustitución puntual de un aminoácido (cisteína por serina). Estos resultados indican ya sea que la actividad enzimática es importante para la activación, que el residuo de cisteína participa en la reacción (por ejemplo interacción por puente disulfuro con alguna molécula) o bien que la enzima mutante presenta algún cambio conformacional que perturba su reconocimiento por las células. El estudio de la función peroxidasa y su participación en la activación de macrófagos, mostró resultados diferentes a los obtenidos con la peroxirredoxina 1 humana, cuya capacidad inmunomoduladora es independiente de la actividad peroxidasa pero sí dependiente de la actividad chaperona [133].

En cuanto al rol de la cisteína peroxidática en la interacción directa con otras proteínas o moléculas, se ha reportado recientemente que la peroxirredoxina típica de dos cisteínas de levaduras Tsa1, interactúa directamente a través de la cisteína peroxidática con la enzima piruvato quinasa, regulando la gluconeogénesis [131]. Por lo tanto, a pesar que aún no se ha demostrado la interacción directa entre cTXNPx con otras proteínas, no podemos descartar esa posibilidad.

Realizamos también ensayos con la proteína recombinante expresada en una cepa de *E. coli* modificada, que presenta una versión truncada del LPS, denominada ClearColi [293], la cual fue purificada con columna de remoción de endotoxinas. Evaluamos la producción de citoquinas por PCR cuantitativa en tiempo real, comparando la respuesta al preincubar cTXNPx y LPS con o sin polimixina B. Como se puede ver en la Figura 52, al incubar los macrófagos con LPS, observamos una inducción de IL12p40, iNOS e IL6 así como una disminución de la expresión de arginasa1 e IL10, lo cual es esperado para el perfil proinflamatorio del LPS. Esta estimulación fue completamente impedida cuando el LPS fue pre incubado con polimixina B. Por otro lado, al preincubar la proteína recombinante con polimixina B, notamos que si bien hay una disminución de la capacidad estimuladora de cTXNPx, esta no es abolida completamente. La disminución en la capacidad activadora de cTXNPx mediada por polimixina puede deberse a una contaminación con endotoxinas en la muestra, pero también podría ser que la polimixina interfiriera con la unión cTXNPx-célula. Medimos también el efecto de cTXNPx en macrófagos con y sin el bloqueo con un anticuerpo específico anti cTXNPx, si bien pudimos neutralizar una pequeña parte del

efecto, lo mismo sucedió con un anticuerpo inespecífico anti IgG, indicando que el efecto observado es inespecífico.

De todas maneras, estos resultados hay que interpretarlos con cautela, ya que al observar el mismo perfil de activación utilizando cTXNPx que LPS, no podemos estar completamente seguros de la especificidad de la respuesta. En el caso de la HSP60 humana, muchos trabajos muestran que es capaz de activar NF- κ B actuando como una alarmina [294], sin embargo recientemente se ha expresado la proteína en el sistema de ClearColi y se determinó que la proteína por si sola es incapaz de activar NF- κ B [295]. Se ha demostrado también que el LPS es capaz de unirse directamente a la HSP60 en una relación 2:1 LPS HSP60, y que el efecto inmunoestimulador es mediado por el LPS asociado a la proteína [296]. Estos datos sugieren que aún con una cuantificación de endotoxinas correcta, el sistema de expresión en bacterias tiene sus limitaciones a la hora de estudiar inmunomodulación. En un futuro cercano nos planteamos la expresión en un sistema libre de endotoxinas y más similar al parásito, como por ejemplo el de *Leishmania tarentolae* que es muy usado como sistema de expresión eucariota [297]. Otra opción sería purificar directamente la proteína de epimastigotas de *T. cruzi* mediante cromatografía de afinidad, sin embargo la gran desventaja de esta técnica es el bajo rendimiento obtenido en comparación con la expresión en sistemas procariotas.

En suma, nuestros resultados sugieren que cTXNPx es capaz de inducir una respuesta proinflamatoria en macrófagos. Si bien el LPS parecería contribuir al efecto proinflamatorio observado, nuestros resultados sugieren que parte de respuesta observada es específica de la proteína. Esta afirmación está basada en dos observaciones: en primer lugar, aun en presencia de polimixina B podemos observar un efecto inflamatorio, y en segundo lugar, el efecto de la proteína sobre las células es específico de cTXNPx y no de cTXNPxC52S. Debido a que ambas proteínas fueron purificadas de la misma manera y presentan niveles de endotoxinas comparables, la diferencia de los efectos observados sugiere que no serían mediados por el LPS.

Además de la cTXNPx, otras moléculas secretadas por el parásito han demostrado tener propiedades inmunomoduladoras. Un ejemplo es Tc52, la cual se demostró que induce la maduración de células dendríticas y activación de macrófagos *in vitro*, así como la generación de una respuesta inmune celular que contribuye al control del parásito en la fase aguda *in vivo* [46, 47]. Miembros de la familia TS mostraron la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedero [298, 299], y su administración como vacunas contribuye al control de la infección en modelos de ratón [300] [301]. La proteasa Cz secretada por el parásito también contribuye a la respuesta inmune del parásito [302], así como al control

de la infección al ser inyectada en animales [303]. Esto demuestra que las proteínas secretadas juegan un rol esencial en la interacción con el hospedero y en el desarrollo de la enfermedad.

8- cTXNPx, induce una respuesta celular del tipo Th1 así como una respuesta humoral específica *in vivo*.

Nuestros resultados *in vitro* mostraron que los macrófagos eran capaces de fagocitar cTXNPx y de activarse de una manera clásica, lo cual es necesario para comenzar una respuesta inmune innata. Esto nos llevó a preguntarnos si *in vivo*, la proteína era capaz de generar una respuesta inmune adaptativa, como ya lo sugerimos. Para ello, inyectamos cTXNPx y cTXNPxC52S libres de endotoxinas junto con controles (Tabla 8) durante dos semanas para generar una respuesta adaptativa. A las 48 horas de la última inyección, los animales fueron sacrificados para determinar la expresión de ciertas citoquinas en esplenocitos y en macrófagos peritoneales. También obtuvimos sangre de los distintos animales para evaluar la producción de anticuerpos específicos por ELISA (Figura 56). El análisis de citoquinas por PCR cuantitativo en las células de la cavidad peritoneal de los distintos grupos, mostró que en el grupo inyectado con cTXNPx, (pero no en el *Mock* ni en el control inyectado con PBS) había una inducción de la expresión de *fizz1*, y en menor medida de *arg1*. Junto con la sobreexpresión de *fizz1* y *arg1* pudimos detectar una disminución en la expresión de *inos* y de *tnf* (Figura 54). Tanto *fizz* como *arg1* han sido utilizado como marcadores de macrófagos alternativamente activados o M2, y son fuertemente inducidos por IL-4 [304]. Los macrófagos alternativamente activados participan en la remodelación del tejido y la reparación de heridas [52], lo cual podría explicar su presencia en el peritoneo luego del desafío inflamatorio con cTXNPx. Este resultado podría parecer contradictorio con los resultados que obtuvimos para los ensayos *in vitro*, donde encontramos un fenotipo de activación clásica de macrófagos, sin embargo ambos experimentos no son comparables, en primer lugar porque en el ensayo *in vivo* evaluamos la respuesta al desafío prolongado (12 días) con cTXNPx. Además de esta consideración sobre los tiempos, cabe señalar que se acepta ampliamente que la polarización de los macrófagos está fuertemente influenciada por el microentorno de citoquinas y celular, es por eso que muchas veces existe una inconsistencia entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* [305]. En este trabajo, utilizamos células de la cavidad peritoneal (PEC), las cuales están formadas por una mezcla de células diferentes (macrófagos, células dendríticas, linfocitos entre otros) sin embargo, luego de seleccionar las células adherentes se obtiene una población celular altamente enriquecida en macrófagos peritoneales (cerca del 50 %) [158]. La complejidad de la población de macrófagos así como el cambio en su composición y fenotipos luego de estímulos, ha sido estudiado recientemente utilizando secuenciado profundo de células únicas [306]. Se ha encontrado que existen dos poblaciones de macrófagos residentes en el peritoneo los cuales presentan

marcadores diferentes, los LPM (“Large Peritoneal Macrophages”) y los SPM (“Small Peritoneal Macrophages”). Durante la infección o el estímulo inflamatorio estéril, existe una reestructuración de esta población, la cual lleva a cambios en los genes expresados en esta población [306]. Para poder evaluar la dinámica en el fenotipo de los macrófagos durante el desafío *in vivo* con la proteína se podría analizar la respuesta hacia la proteína luego de su inoculación intraperitoneal.

Por otro lado, el análisis de los esplenocitos obtenidos de los animales inyectados con las proteínas recombinantes mostró una respuesta T del tipo Th1, específica para cTXNPx. Esta respuesta fue caracterizada por una secreción de IFN γ tras el reestímulo *in vitro*, sin cambios en la producción de IL4 ni de IL10 con respecto al control (Figura 55). La producción de IFN γ por parte de los linfocitos T es fundamental para la acción microbicida de los macrófagos, así como para aumentar la expresión de moléculas de MHC I y II, esto significa que la inducción de la respuesta mediada por cTXNPx podría estimular mecanismos efectores contra *T. cruzi*. De hecho, la capacidad de los linfocitos T citotóxicos de producir IFN γ frente antígenos específicos del parásito, se relacionó con la severidad de la manifestación clínica de la infección [307]. La inducción de la producción de IFN γ por linfocitos cTXNPx específicos podría sugerir que esta proteína podría participar en el control del parásito *in vivo*.

Por último, estudiamos la respuesta humoral en los animales inyectados en los distintos grupos. Encontramos que los ratones inyectados tanto con cTXNPx como con cTXNPxC52S, presentaban antisueros capaces de reconocer la proteína recombinante (Figura 56). En este contexto, resultados preliminares indican que pacientes chagásicos presentan sueros reactivos contra cTXNPx (Figura 57), si bien aún no tenemos muestras suficientes para poder correlacionar la severidad de la patología chagásica con la presencia de anticuerpos anti cTXNPx. Por otro lado, de comprobarse la relación entre la manifestación de la enfermedad y la inmunoreactividad contra cTXNPx, podría encontrarse una utilidad clínica para estos anticuerpos.

I. CONCLUSIONES

- 1- La interacción temprana de *T. cruzi* con células epiteliales genera una reprogramación de la expresión génica en el hospedero, con más de 1500 genes que cambian su expresión.
- 2- Las principales alteraciones en la célula están relacionadas con respuesta del tipo proinflamatoria, una respuesta a estrés, proliferación y diferenciación. Las células infectadas secretan altos niveles de IL8, principalmente de manera dependiente de NF-kB e independientemente de la señalización del daño en el ADN.
- 3- El análisis de vías alteradas reveló que existe activación de la respuesta al daño en el ADN y resistencia a la apoptosis en las células infectadas.
- 4- Tanto la infección como la interacción con cTXNPx induce una alteración del metabolismo lipídico, particularmente a nivel del transporte y síntesis de colesterol.
- 5- El análisis transcriptómico de los estadios de *T. cruzi* reflejó las características metabólicas que presentan estos parásitos durante las adaptaciones a los distintos hospederos.
- 6- Demostramos la secreción de cTXNPx en dos estadios del parásito tanto en vesículas como libre de vesículas, y su interacción con macrófagos y células epiteliales humanas.
- 7- La interacción de cTXNPx con células epiteliales conduce a la activación de la MAP quinasa ERK y a la proliferación. La proteína también induce estrés del retículo endoplásmico y aumenta la susceptibilidad a la infección.
- 8- cTXNPx es capaz de activar macrófagos *in vitro* de una manera clásica, y este efecto es específico para la forma activa de la proteína.
- 9- *In vivo* cTXNPx induce una respuesta inmune celular del tipo Th1 y humoral específica contra la proteína.

J. ANEXOS

1. ANEXO 1

Genes sobreexpresados blancos de NF- κ B en células epiteliales infectadas

Cytokines/chemokines

- Gro α
- IL1 α
- IL1 β
- IL6
- IL8
- IL11
- TNF α

Immunoreceptor

- CD80 (co estimulación de T cells)

Cell adhesion molecules

- ICAM-1
- P-selectin
- Tenascin C

Acute Phase Protein

- Serum amyloid A precursor

Cell Response Proteins

- COX2
- iNOS
- SOD Mn
- Phospholipasa A2

Receptors

- CD69
- LOX-1

Growth Factors

- G-CSF
- PDGF

Transcription Factors

- A20
- cREL
- ikB α
- JUN (AP1)
- NFkB1
- NFkB2
- P53

2. ANEXO 2 PUBLICACIONES

Research Article

Early *Trypanosoma cruzi* Infection Reprograms Human Epithelial Cells

María Laura Chiribao,^{1,2} Gabriela Libisch,¹ Adriana Parodi-Talice,^{1,3} and Carlos Robello^{1,2}

¹ Unidad de Biología Molecular, Montevideo 11400, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11300, Uruguay

³ Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

Correspondence should be addressed to Carlos Robello; robello@pasteur.edu.uy

Received 6 December 2013; Revised 27 February 2014; Accepted 27 February 2014; Published 9 April 2014

Academic Editor: Wanderley de Souza

Copyright © 2014 María Laura Chiribao et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, has the peculiarity, when compared with other intracellular parasites, that it is able to invade almost any type of cell. This property makes Chagas a complex parasitic disease in terms of prophylaxis and therapeutics. The identification of key host cellular factors that play a role in the *T. cruzi* invasion is important for the understanding of disease pathogenesis. In Chagas disease, most of the focus is on the response of macrophages and cardiomyocytes, since they are responsible for host defenses and cardiac lesions, respectively. In the present work, we studied the early response to infection of *T. cruzi* in human epithelial cells, which constitute the first barrier for establishment of infection. These studies identified up to 1700 significantly altered genes regulated by the immediate infection. The global analysis indicates that cells are literally reprogrammed by *T. cruzi*, which affects cellular stress responses (neutrophil chemotaxis, DNA damage response), a great number of transcription factors (including the majority of NF κ B family members), and host metabolism (cholesterol, fatty acids, and phospholipids). These results raise the possibility that early host cell reprogramming is exploited by the parasite to establish the initial infection and posterior systemic dissemination.

1. Introduction

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, has the peculiarity, when compared with other intracellular parasites, to invade almost any type of cell. In *T. cruzi*, pathogen-associated molecular patterns involve a great number of surface molecules that induce changes in cell signaling of host cells [1]. The early cell infection by cell-derived trypomastigotes involves adhesion, penetration, and transit through host cell parasitophorous vacuoles in order to establish an intracellular infection. In this sense, trypomastigotes must interact through their surface with host-surface molecules in order to generate signaling and/or metabolic changes that favor infection. As an obligate intracellular protozoan parasite, *T. cruzi* has evolved several mechanisms for recognition, adhesion, and penetration. Particularly, the presence of hundreds of copies of several gene families coding for surface glycoproteins [2] and the simultaneous expression

of several genes of each family [3] are probably responsible for this pathogen's ability to infect a wide range of cell types. However, little is known about the specific responses of each different cell type. Most of the focus has been placed on the study of macrophages and cardiomyocytes, since they are responsible for host defenses and antigen presenting or cardiac lesions in Chagas disease, respectively [4, 5]. However, when these parasites enter their host through a skin lesion, by contact with mucous tissue or by ingestion, the establishment of the infection depends on its ability to rapidly invade epithelial cells that constitute the first barrier against infections. The epithelium provides both a physical barrier and a variety of antimicrobial factors to avoid microbial entry [6]. In this sense, parasites must be able not only to invade epithelial cells, but also to insure dissemination and the establishment of a future chronic infection.

The study of gene expression profiles during infection constitutes a very powerful tool in order to compare global

responses of several kinds of cells, allowing the identification of new genes and/or pathways implicated in the establishment of the infection and pathogenesis. Although several reports have been published with these approaches, a high variability in parasite strains, host cells, mammal species, and times of infection generate a complex picture and few general conclusions. Cardiac cells have been the most studied using mice models [7–9], revealing hundreds of differentially expressed genes in infected cells. The response of mice macrophages has also been studied at 24 hours postinfection, comparing different stimuli and cytokine profiles [10]. Recently, Caradonna et al. analyzed the medium and late responses (18 hs and 72 hs, resp.) to *T. cruzi* in HeLa cells, through a different approach (genome-wide RNAi screen [11]) showing the relevance of host metabolism on intracellular *T. cruzi* growth. In this work, we focused our study on the early response of human cells to *Trypanosoma cruzi* infection. It is important to note that previous reports show that the early response of human cells to *T. cruzi* involves minimal modulation of gene expression, particularly in HeLa cells, where few changes were described in the early infection [12, 13]. Epithelial cells were used as a model since, as described above, they constitute the first barrier against infection. As expected, strong changes in gene expression profiling were found immediately after parasites contacted host cells, involving reprogramming of gene expression in the first 6 hours of infection.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Cultures, Parasites, and Infection Assays. HeLa human cell line was grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Dm28C *T. cruzi* strain was used throughout this work [14].

For infection assays, cell-derived trypomastigotes were incubated with semiconfluent HeLa cells (10:1 parasite:cell ratio) during 4 hours at 37°C in DMEM supplemented with 2% FBS. After interaction period, parasites were removed, and cells were washed with PBS twice and incubated with DMEM with 2% SBF. Cell samples were taken at 0, 3, and 6 hours after the interaction period henceforth named t_0 , t_3 , and t_6 , respectively.

2.2. RNA Extraction and Microarray Procedures. Total RNA was isolated with phenol/chloroform as described by the manufacturer (Tri Reagent, Sigma-Aldrich, USA). Processed samples were quantified in a spectrophotometer (NanoDrop 1000 and Thermo Scientific), exhibiting a high content of total RNA and a good quality without degradation, according to the RIN (RNA integrity number) values obtained from a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), which were all above 8. Microarray analysis was performed using a 4 × 44 K Human Genome Oligo Microarray (G4112F, Agilent), in a One-color design. A 200 ng aliquot of total RNA was reverse-transcribed into cDNA, and this was transcribed into cRNA and labeled using the Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-color (Agilent Technologies). The labeled cRNA was purified with Illustra RNAspin mini Isolation kit

(GE Healthcare, USA). The quality of each cRNA sample was verified by total yield and specificity calculated based on NanoDrop ND-1000 spectrophotometer measurements (NanoDrop Technologies, USA).

After that, we proceeded with the hybridization, washing, assembling of the chips, and scanning, according to the protocol specified by Agilent. The glass slides were scanned using an Agilent microarray scanner G2565BA and default settings for all parameters. The labeled samples were placed in human hybridizing chips for 17 h at 60°C with a 10 rpm rotation. Successive washings were done with different washing, stabilization, and drying solutions according to Agilent's Low Input Quick Amp Labeling Kit protocol. We used Agilent Feature Extraction (version 9.5.1) for quality control, data filtering, and data normalization. The software also converts the scanned images in quantitative data for further analysis. The software automatically finds and places microarray grids, rejects outlier pixels, accurately determines feature intensities and calculates log ratios (Agilent's processed signal value), flags outlier pixels, and calculates statistical confidences. It also performs dye normalization within arrays using Lowess normalization. Three biological replicates were performed to each condition.

Microarray experiments were statistically compared using GeneSpring software 12.0 GX. Genes significantly up- and downregulated were identified by the ANOVA-test with a *P* value of 0.05 and a Benjamini-Hochberg false discovery rate correction for multiple testing.

2.3. Real-Time RT-PCR. The RNA samples used in the microarray experiment were used to validate some of the differentially expressed genes, through real-time PCR. For each sample, cDNA was synthesized by reverse transcription using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) with Oligo(dT) primers and 500 ng of total RNA added as a template. The primer sequences and expected product length of amplicons are listed in Supplementary Table 1 (see Table S1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/439501>). Almost all the primers used span an exon-exon junction to avoid DNA amplification (Supplementary Table 1). Real-time reactions were performed using 5 µL Sybr Green (KAPA SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix, Kapa Biosystems), 200 nM of forward and reverse primers, and 1 µL of a 1/5 dilution cDNA, in a final volume of 10 µL. Samples were analyzed in duplicate in an Eco real-time PCR System (Illumina). Standard amplification conditions were 3 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 30 s at 72°C. After each PCR reaction, the corresponding dissociation curves were analyzed to ensure that the desired amplicon was being detected and to discard contaminating DNA or primer dimers.

The threshold cycle (CT) value for each gene was normalized to GAPDH, calculating the ΔCt for each gene in all samples (3 replicates of control and infected cells at t_0). The comparative CT method ($\Delta\Delta Ct$ method) was used to determine the relative quantity of the target genes, and the fold change in expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$.2,5.

2.4. Western Blot. Lysates of control and infected HeLa cells were obtained by washing and resuspending monolayers directly in Cell Lysis Buffer (Promega). After centrifugation at 12000 g for 10 minutes, protein extracts were resolved by SDS-PAGE in a 12% polyacrylamide gel under reducing conditions and electrotransferred to Amersham Hybond ECL Nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked in 5% skimmed milk and 0.1% Tween 20 in PBS for 1 hour at 22°C. After washing with 0.1% Tween PBS, blots were incubated with an appropriate dilution of primary antibody, overnight at 4°C, in 1% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) and 0.1% Tween 20 in PBS. After three washes, a dilution of peroxidase conjugated anti-mouse antibody (DAKO) was applied at room temperature for 1 hour. The signal was developed with Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific).

2.5. Red Nile Staining. For Red Nile staining assay, cells were seeded in 12-well plates with coverslips and infected with trypomastigotes for 4 hours. After 0, 3, and 6 hours (t_0 , t_3 , and t_6), cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. After fixation, coverslips were incubated with 0.1M glycine for 10 minutes and permeabilized with 0.5% Triton-X100 for 5 minutes at room temperature. For neutral lipid staining, cells were incubated for 10 minutes at 37°C with 500 nM Red Nile (Sigma) and rinsed with PBS. Coverslips were mounted with Fluoroshield with DAPI (Sigma) and visualized in a LeicaTCSSP5 Confocal Microscope.

3. Results

3.1. Trypanosoma cruzi Early Infection Remodels HeLa Cell Gene Expression. The effect of *T. cruzi* early infection on host gene expression was investigated on infected HeLa cells at 0, 3, and 6 h postinteraction period (t_0 , t_3 , and t_6), representing the initial events of penetration, intravacuolar stage, and the release of parasites to the cytosol, respectively, as previously described [9]. Total RNA extracted from infected and noninfected cells was labeled and hybridized to a Human GE 4 × 44 K Microarray (Agilent), which allows the evaluation of the gene expression profile of 19,596 different human genes. Genes showing at least a 2-fold change in their expression and a 95% probability of being differentially expressed ($P < 0.05$) were considered to be significantly regulated by the infection. The total number of significant differentially expressed genes is shown in Figure 1: more than a thousand genes are upregulated in the early response to infection, whereas less than 400 genes were downregulated, when comparing control versus *T. cruzi* infected cells. Major changes were observed at 3 hr postinfection, with a total of 1700 differentially expressed genes. During the course of the early response to the infection most of the upregulated genes (946) changed at t_0 and remained in this condition in all further times (Figure 2(a)). In contrast, only 28 genes remained downregulated during the 6-hour period (Figure 2(b)). A selection of 300 upregulated and 100 downregulated genes is presented in Supplementary Table 2.

3.2. Gene Ontology (GO) and Pathway Analysis. GO and pathway analysis were performed using GeneSpring (Agilent Technologies), comparing each time point with control cells, indicating that a wide range of biological processes was altered immediately after infection, the most relevant ones being immune response, cellular defense mechanisms, proliferation/differentiation, metabolism, and cell signaling (Figure 3(a)). However, at each stage of the early infection the most affected pathways differ significantly when comparing each condition with the previous one (Figure 3(b)). Hence the major expression changes in the proinflammatory response take place at t_0 (e.g., Toll-like receptor pathway and TNF- α and TGF- β signaling), and the remodeling of metabolism is maximal at t_3 (e.g., folate metabolism and lipid metabolism), whereas at t_6 the highest changes tend towards transport processes and stress response other than immune responses (e.g., DNA damage response and signaling by G protein receptors). An overview of the most affected pathways is shown in Figure 4. Representative genes of the affected pathways were further evaluated by real-time PCR (Figure 5), confirming these results.

As previously reported [7, 9, 12, 15], infection of mammalian cells (other than epithelial ones) by *T. cruzi* elicits a strong response whose major contribution is due to interrelated inflammatory, apoptotic, stress, and proliferative responses. In the present model of early response of epithelial cells we found that more than 50% of the affected pathways were related to these processes, mainly at t_0 (Figures 3 and 4). The intensity of this response is more evident when only those genes that are upregulated more than 10 times with respect to the control are grouped (Table 1).

3.3. The Predominance of Neutrophil Chemotactic Factors. With respect to inflammation related genes, most of them are presented in Table 1: namely, they are highly overexpressed and, as expected, major changes occur in cytokines and chemokines. Remarkably, the most upregulated chemokines have similar functions: recruitment of professional phagocytic cells (CXCL1, CXCL2, and IL-8), particularly neutrophils. Besides, the common receptor for some of them (CXCR2) is also overexpressed. It is worth mentioning that IL-8 is a chemotactic factor rather than a classical cytokine (currently named CXCL8) and was discovered as “neutrophil chemotactic factor” [16].

3.4. Regulation of Genes Controlling Cell Survival. Concerning programmed cell death, the predominance of a high number of genes related to inhibition of apoptosis is notorious. In particular, the antiapoptotic genes BIRC3 at t_0 and BCL2A1 at t_3 reach a maximum of 23-fold and 27-fold increase on their expression, respectively, and they remain highly overexpressed along the early response. The proliferative response is more relevant at t_0 and the main pathways involved are TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) signaling pathway, which relates the inflammatory and proliferative responses through NF κ B signaling. The Wnt signaling pathway is also significantly altered during early infection (Supplementary Table 3). It is noteworthy

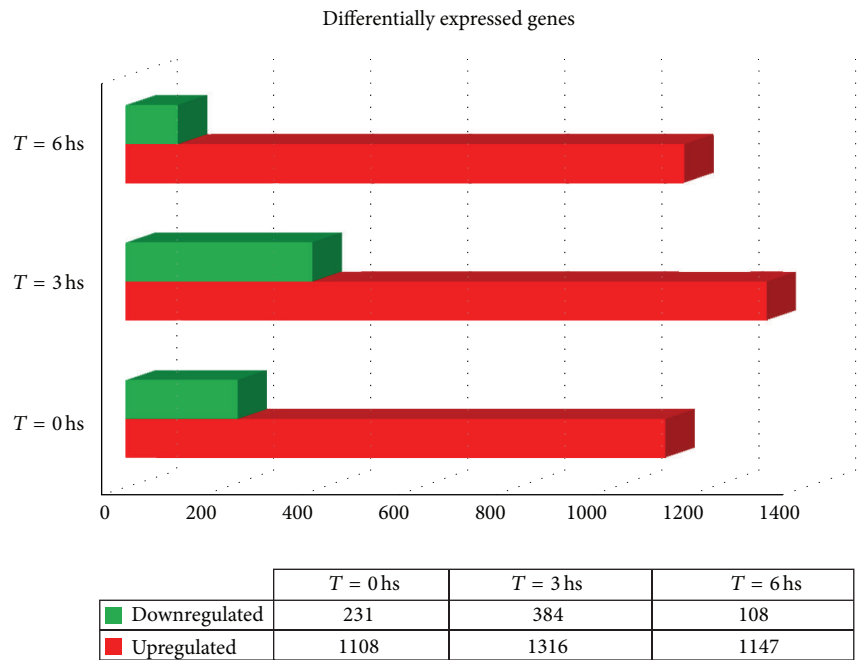


FIGURE 1: Differential gene expression in *T. cruzi* infected HeLa cells at t_0 , t_3 , and t_6 compared to noninfected control cells (≥ 2 -fold, $P \leq 0.05$). Red bars indicate upregulated genes and green bars indicate downregulated genes. Inset table shows number of differentially expressed genes for each condition.

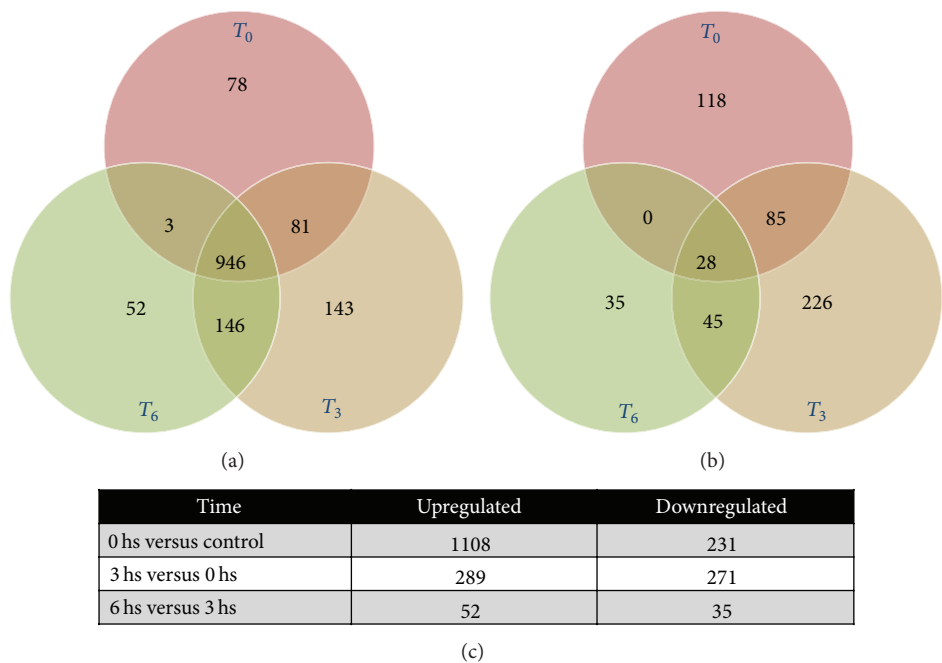


FIGURE 2: Venn diagrams comparing (a) upregulated and (b) downregulated genes (fold change ≥ 2 , $P \leq 0.05$) with respect to control cells; (c) number of genes up- or downregulated, comparing one condition to the previous one (t_0 versus C, t_3 versus t_0 , and t_6 versus t_3) using fold change ≥ 2 and $P \leq 0.05$.

that, among the proliferative response related genes, there is a synergism with the highly induced chemokines: the colony stimulating factor 3, specific for neutrophils, is seven-fold upregulated immediately after infection (Supplementary Table 2).

3.5. Transcription Factors in the Early Response to Infection. Many of the differentially regulated genes following infection were transcription factors whose function affects the expression of many genes (see specific heat map in Figure 3). In Supplementary Table 4 a list of the up- and downregulated

TABLE 1: Overexpressed genes with fold change ≥ 10 at any time postinfection ($P \leq 0.05$).

Gene ID	Description	FC- t_0	FC- t_3	FC- t_6
Immune response				
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	85,2	93,3	14,5
CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	39,9	23,1	3,1
CD96	CD96 molecule	27,4	24,4	24,2
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	20,0	18,9	7,6
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	49,8	12,3	6,2
CXCL3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	64,9	12,7	4,1
EREG	Epiregulin	9,2	13,8	4,1
IL1A	Interleukin 1, alpha	18,0	6,3	2,3
IL6	Interleukin 6	27,3	6,9	2,6
IL8	Interleukin 8	326,9	67,9	16,6
OLR1	Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	16,2	24,9	14,7
PTX3	Pentraxin 3, long	13,8	13,1	9,3
Apoptosis inhibition				
BCL2A1	BCL2-related protein A1	16,4	27,4	8,2
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	23,6	7,2	2,8
Transcription				
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	11,6	12,4	4,6
MYCL1	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1	2,2	5,5	10,7
RELB	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	11,0	9,3	5,0
Signalling				
RGR	Retinal G protein coupled receptor	20,7	24,1	20,4
PRKG1	Human mRNA for type I beta cGMP-dependent protein kinase	22,2	27,7	24,0
Binding				
MUC4	Mucin 4, cell surface associated	1,9	10,7	4,5
SDC4	Syndecan 4	11,4	7,7	2,5
STATH	Statherin	10,7	13,2	10,9
Transport				
SLC9A6	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6	12,7	13,7	11,3
Fatty acid synthesis				
ELOVL7	ELOVL fatty acid elongase 7	10,8	10,3	5,1
Stress response				
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	15,2	3,3	3,2
Other				
TCL6	T-cell leukemia/lymphoma 6 (nonprotein coding)	28,4	28,3	26,1
TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3	19,4	28,9	10,6
WFDC10A	WAP four-disulfide core domain 10A	3,2	10,0	10,1
NCRNA00246A	nonprotein coding RNA 246A	10,0	11,9	11,3
LOC283174	Hypothetical LOC283174	44,3	39,9	40,4
FLJ44715	cDNA FLJ44715 fis	18,8	21,0	19,6
A1BG	cDNA FLJ31639 fis	29,1	39,1	30,8
ART3	ADP-ribosyltransferase 3	2,2	5,8	12,5

transcription factors is presented: as can be seen, several members of the NF κ B family (Table 2) change their expression, suggesting activation by different pathways. Particularly RELB, related to the noncanonical pathway, is among the most upregulated genes. Several members of adaptor-related protein complex 1 (AP-1) family proteins were also upregulated, such as JUN, JUND, ATF2, FOSL1, and FOSL2. These transcription factors regulate a variety of activities including

proliferation, apoptosis, and inflammation in response to different stress signals including microbial infections [17]. Another remark is that 15% of the downregulated genes are transcription factors.

3.6. Induction of DNA Damage Response Related Genes. The expression of genes involved in DNA damage response (DDR) pathways was significantly regulated by infection.

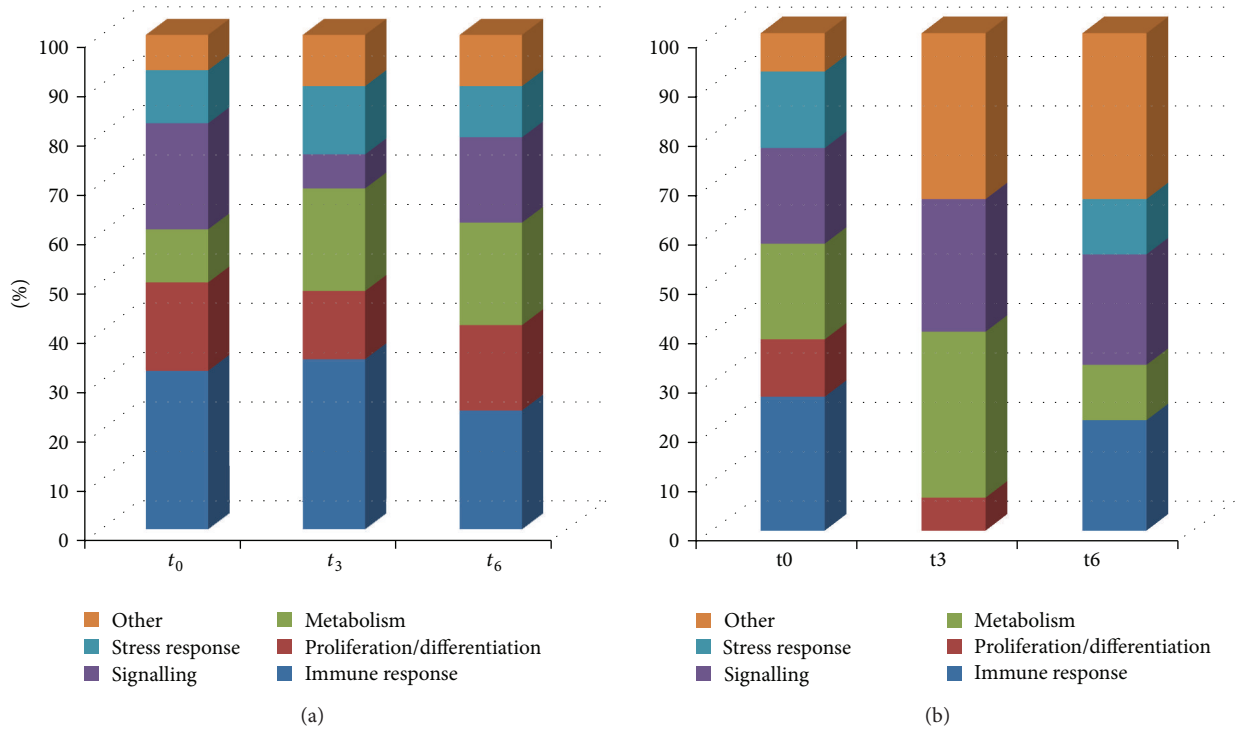


FIGURE 3: Cellular processes predicted to be modulated during *T. cruzi* infection. (a) Pathways analysis with upregulated genes from t_0 , t_3 , and t_6 ; (b) pathways analysis with upregulated genes comparing t_0 versus C, t_3 versus t_0 , and t_6 versus t_3 , showing characteristic pathways altered at each time point.

TABLE 2: Members of NF κ B family differentially expressed during infection with *T. cruzi*.

Gene	FC- t_0	FC- t_3	FC- t_6
NKFB1	4,0	2,2	1,4
NFKB2	4,1	3,7	2,2
REL	2,5	1,3	-1,0
RELB	11,0	9,3	5
NFKBIA	4,2	1,3	1,5
NFKBIE	3,2	1,7	1,8
NFKBIZ	4,2	1,2	1,8

DDR is a highly coordinated cellular system able to sense and counteract DNA damage caused by a variety of environmental and endogenous genotoxic insults [18]. Among all the genes related to DDR transduction pathways, we grouped those involved in DNA repair mechanisms and those related to cell cycle regulation (Figure 6). Among DNA repair-related genes, there are several encoding for enzymes involved in DNA metabolism that were induced upon infection such as polymerase (DNA directed) kappa (POLK), polymerase (DNA directed) beta (POLB), RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like) (RECQL), and single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1 (SMUG1). We also detected differentially expressed genes that participate in recruitment of mediators or effectors of

DNA repair such as promyelocytic leukemia (PML), DOT1-like histone H3K79 methyltransferase (DOT1L) and ring finger protein 8, and E3 ubiquitin protein ligase (RNF8). Several genes involved in cell cycle control were found to be modulated after infection. Among these, p15 (CDKN2B) and p21 (CDKN1A), which are cyclin-dependent kinase inhibitors implicated in the suppression of cell proliferation under several stresses, were upregulated upon infection.

3.7. *Trypanosoma cruzi* Alters Host Cell Lipid Metabolism.

A group of host genes significantly regulated by *T. cruzi* were those involved in host lipid metabolism: cholesterol, fatty acids, and phospholipids (Figure 7(a)). Concerning cholesterol metabolism, the most remarkable changes occur in cholesterol transport related genes: low density lipoprotein receptor (rLDL) and oxidized low density lipoprotein receptor (OLR1), responsible for the entry of cholesterol and oxidized cholesterol, respectively, are overexpressed immediately after infection. In particular, OLR1 gene expression is highly upregulated, not only at the transcriptional level (Table 1) but also at the translational level (Figure 7(b)). ABCA1, which mediates the cholesterol flux and has been described to be overexpressed in cells that accumulate cholesterol [19], is also upregulated upon infection. Several genes from fatty acid metabolism are affected, in particular members of the acyl-CoA synthetase family (ACSL6, ACSM5, and AMAC1; Figure 7(a)) and fatty acids transport (SLC27A1) that participate in fatty acid activation and uptake [20]. One of the most overexpressed genes (Table 1) is a very long

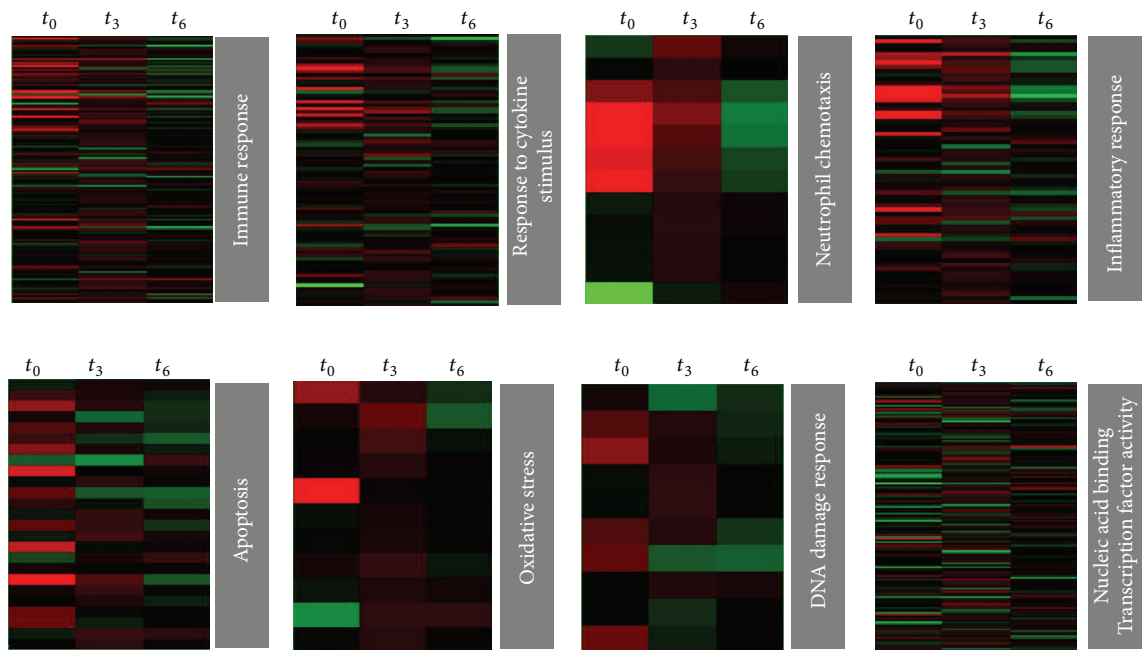


FIGURE 4: Heat maps of some representative biological processes altered during *T. cruzi* infection. Genes regulated by *T. cruzi* involved in immune response/inflammation (top) and genes involved in stress response and transcription factor activity (down) are represented.

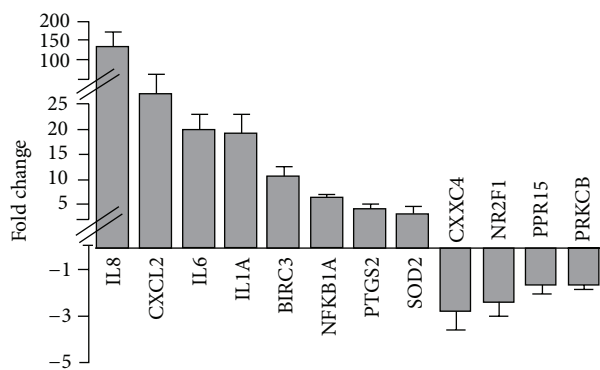


FIGURE 5: Quantitation of selected genes by real-time PCR. Mean relative fold changes of upregulated and down-regulated genes analyzed by qPCR in 3 biological replicates of infected HeLa cells at t_0 relative to that in control cells. Error bar represents SD of replicates. The cross-bars in the y-axis indicate changes in the scale used.

chain fatty acid, elongase 7 (ELOVL7), which elongates fatty acids of 16 to 24 carbons, with the highest activities towards C18-CoAs [21, 22]. Very long fatty acids are essential precursors of signaling molecules related to the arachidonic acid and prostaglandin metabolisms, the limiting pathway being catalyzed by prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2). Consistently, we found that this gene is rapidly overexpressed both at the transcriptional and translational levels (Figure 7(b) and Supplementary Table 2). These changes were so drastic in host cells to the extent that, six hours after penetration, a significant accumulation of lipid bodies was found [23] (Figure 7(c)).

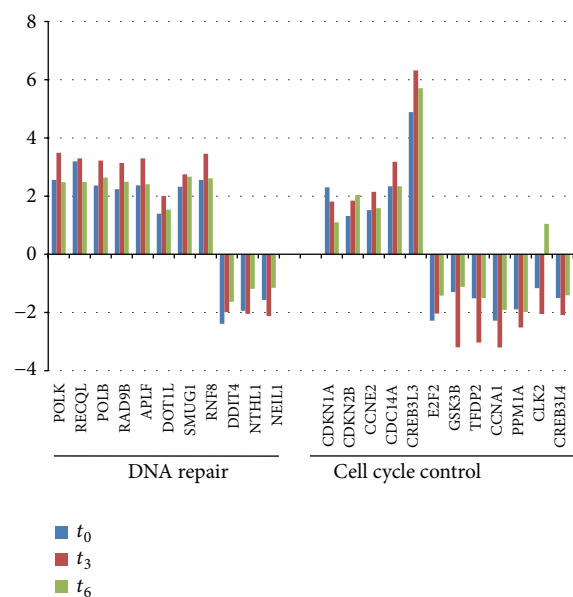


FIGURE 6: Temporal regulation of host genes related to cell cycle control and DNA repair on infected cells.

4. Discussion

The ability of *Trypanosoma cruzi* to invade almost any kind of nonimmune cell makes Chagas a complex parasitic disease in terms of prophylaxis and therapeutics. Since the parasite cannot go through the skin, penetration is possible through the site of the insect bite (mainly after scratching the skin) or by invading mucous tissues (this would include cases of

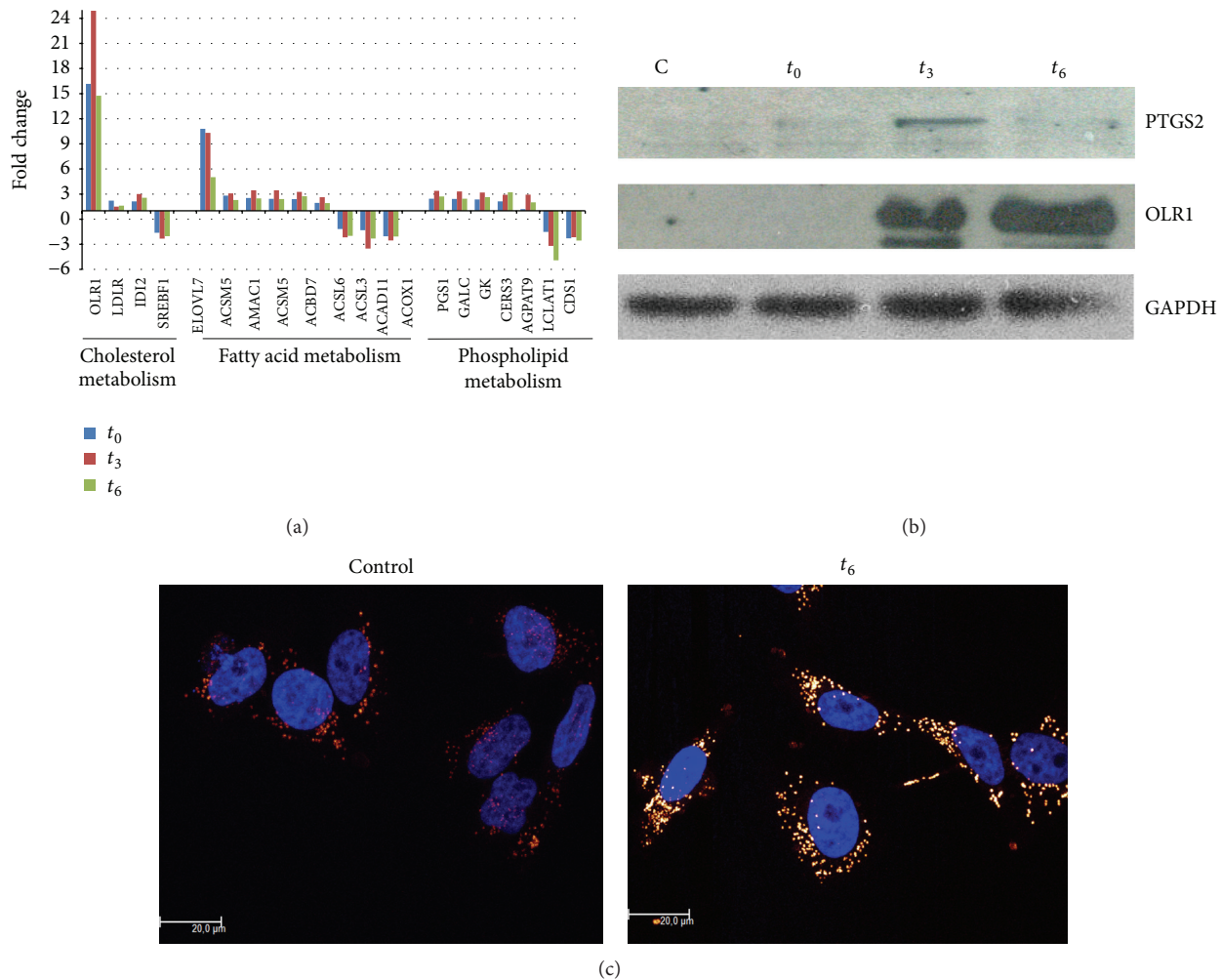


FIGURE 7: (a) Temporal regulation of host genes related to lipid metabolism after infection with *T. cruzi*. (b) Western blot analysis showing overexpression of PTGS2 and OLR1 proteins and normalization with GAPDH. (c) Red Nile staining of control and infected cells at t_6 .

oral infection). In any case, the common physical barrier is constituted by epithelial cells, and the early infection will be relevant for the establishment of a chronic disease. Some reports about transcriptomics of the human cell response in epithelium and fibroblasts showed minimal alterations at the level of gene expression. De Avalos et al. [13] described that only 6 genes were downregulated, whereas no genes were induced in the fibroblast early response to *T. cruzi* infection. On the other hand, in epithelial cells only 41 genes were found to be induced after infection [12]. However, in a more recent work in mice cardiomyocytes [9] the authors made a very complete characterization of the cell response and showed that hundreds of genes changed, a result that is expected for such a complex intracellular parasite. In that context we decided to evaluate the early response to *T. cruzi* by analyzing three time points (t_0 , t_3 , and t_6), in order to get a general view of the response during adhesion/penetration, the intravacuolar stage, and the early cytosolic stage, respectively. The results of this study demonstrated that immediately after contact with human epithelial cells, *T. cruzi* triggers a strong response, where more than 1300 genes were upregulated and

almost 400 genes were downregulated. Most of the regulated genes are involved either in cellular defense, metabolism, or response to stress, including DNA damage response. Some genes of our interest were further evaluated by real-time PCR, and two inflammation related genes were studied at protein level, showing that mRNA upregulation was correlated with protein induction. The major response was achieved at t_0 , and most genes (946) were maintained upregulated during early infection, whereas only 28 of the downregulated genes were common to the three studied time points.

4.1. Cellular Defense Mechanisms. In this work, a number of genes involved in cellular defense mechanisms were found differentially expressed, particularly genes related to inflammation and immune response. This response is characteristic in Chagas disease, and the fact that about 30% of the altered genes belong to this category is not surprising. However, the pattern of chemical mediators differed substantially from previous gene profiling studies involving *T. cruzi*. The majority of the most highly expressed chemokines function as chemotactic factors for neutrophils. Particularly, the most

upregulated gene is IL-8 (327- and 157-fold at t_0 in microarray experiment and RT-PCR, resp.). As was previously described, this molecule is a potent neutrophil chemotactic factor, belonging to the CXC chemokine subfamily, which signals through CXCR1 and CXCR2 G-coupled proteins. The two major effects of IL-8 are chemotaxis of neutrophils and neovascularization. Moreover, it enhances the proliferation and survival of endothelial cells and angiogenesis [24]. This property has been related to the ability of cancer cells to survive and migrate from the primary site [25]. Although this proinflammatory response clearly reflects defense mechanisms against the parasite, we cannot discard that it can be exploited by the parasite as a strategy for survival and dissemination: vascularization and recruitment of cells that can be infected by *T. cruzi*. This strategy for dissemination by PMN attraction and infection has been reported for *Leishmania* infection, mainly through overexpression of IL-8 [26], and also for many intracellular pathogens that can survive in the hostile neutrophil-filled environment, and this enables the subsequent infection of macrophages [27]. CXCR2, the major receptor for IL-8, is also clearly overexpressed, indicating that this chemokine also acts on HeLa cells. Interestingly, IL-8 binding to CXCR2 triggers the rise of intracellular calcium from intracellular stores [28], which may in turn contribute to infection.

An important feature in the infection by *T. cruzi* is the oxidant stress response that is very relevant for the parasite's pathogenesis. Although the oxidative stress generated after the infection is a hallmark of professional phagocytic cells, it has been demonstrated that oxidative stress in nonphagocytic cells is generated by many mechanisms, including dysfunction of mitochondria in infected mice [29] and cardiomyocytes [30] and cytokines signaling like TNF [5], and also by the action of lipoxygenase, cyclooxygenase, and cytochrome P450-dependent oxygenases during arachidonic acid metabolism [31]. In infected epithelial cells we found many enzymes involved in arachidonic acid metabolism and many p450-dependent oxygenases as well as TNF alpha-signaling pathway activity, which suggests that many sources of ROS are active in these cells. Consistent with this idea, many antioxidant enzymes that are known to be upregulated after oxidative stress, particularly mitochondrial superoxide dismutase (SOD2), glutamate-cysteine ligase (GCLC) and hemoxygenase 1 (HMOX1), metallothioneins (MTX), glutathione peroxidase (GPX2), and thioredoxin reductase 1 (TXNRD1), are induced after infection in epithelial cells [32]. It has been proved that exposure to TNF leads to an acute GSH depletion in epithelial cells due to its oxidation to GSSG. The reduction of GSH is sensed by stressed cells mainly through redox-sensitive transcription factors (AP-1 and NfκB), causing phosphorylation and degradation of IκB, which is a critical step for NfκB activation [33, 34]. On the other hand, the activation of NfκB regulates the expression of many proinflammatory cytokines like IL-8, IL-6, and TNF α, as well as antioxidant enzymes [35]. Due to the interconnection among inflammation and oxidative stress, it seems that the appropriate balance between proinflammatory and prooxidant and antioxidant and anti-inflammatory mediators could be responsible for the overall

response in Chagas disease infection [36, 37]. As in infected cardiomyocytes [38], this balance could also determine the activation of DDR seen in infected epithelial cells and also the resolution of these pathways leading either to senescence, DNA repair, or apoptosis.

4.2. *Trypanosoma cruzi* Early Infection Regulates Genes Involved in Metabolism. Genes involved in cellular metabolism were found to be regulated during early *T. cruzi* infection. This is a common observation in host-pathogen interactions, although in the case of *T. cruzi*, metabolism remodeling has been widely associated with the generation of ATP by host cells [11]. In this study, a strong component of lipid metabolism was found, mainly affecting genes related to cholesterol, fatty acid, and phospholipid metabolism. Remarkably, OLR1 is one of the most upregulated genes and its expression at the translational level indicates that the expression of the receptor peaks at 3 hours after invasion. In *T. cruzi*, it was previously reported that infection enhances LDL receptor expression, which is used by the parasite to enter host cells [39]. We also found upregulation of this receptor gene but at a lower level, whereas OLR1 is more than 15-fold overexpressed along the experiment when compared to noninfected cells. It has been demonstrated that *Chlamydia pneumoniae* induces overexpression of OLR1, which in turn serves as a gateway for *Chlamydia pneumoniae* invasion [40–42]. The finding of a strong upregulation of OLR1 deserves further studies in order to evaluate whether it can constitute a new strategy of *T. cruzi* invasion. Finally, since OLR1 is a relevant factor in the development of atherosclerotic lesions, this strong upregulation during *T. cruzi* infection can explain, at least in part, the major susceptibility to atherosclerosis in *T. cruzi* infected mice [43].

Concerning fatty acid metabolism, it was recently described that, during the medium and late *T. cruzi* infection of HeLa cells, perturbations in host fatty acid metabolism alter intracellular parasite growth rates [11]. In particular, Caradonna et al. showed that the genes coding for proteins involved in activation/transport of VLCFAs (SLC27A2) and β-oxidation (ACAA1 and IDH1) in peroxisomes directly affect intracellular amastigotes growth. Interestingly, here we found that SLC27A1 gene is overexpressed in infected cells. SLC27A1 codes for a long chain fatty acid (LCFA) transporter, located in the plasma membrane. Taken together, these results allow us to hypothesize that both events are connected: during the early infection parasites favor LCFA cell uptake and elongation of LCFA to VLCFA through ELOV7 overexpression. These VLCFAs will be used in peroxisomes for β-oxidation during the medium and late infection [44]. However, it should be remarked that energy production is not the most important role of VLCFAs: they are relevant for many physiological processes like membrane composition maintenance, inflammatory responses, and neutrophil migration, as well as in the synthesis of signaling molecules like eicosanoids, sphingosine 1-phosphate, and precursors of prostaglandins biosynthesis [21, 22, 45]. In this sense, the induction of PTGE2 in the early infection suggests a coordinated function with ELOVL7. Which is the relative relevance of the different roles of VLCFAs with respect to the

parasite survival and establishment of the infection remains to be elucidated.

Finally, several genes coding for phospholipid metabolism related enzymes were regulated under infection, such as CER3, which is essential for epidermal lipid homeostasis [46], AGPAT9, and PGS1, while LCLAT1 and CDS1 were downregulated, suggesting the relevance of phospholipid metabolism in signaling and membrane homeostasis during *T. cruzi* early infection. All of these results led us to evaluate the presence of lipid bodies in the immediate response of HeLa cells to *T. cruzi*. Lipid bodies constitute lipid rich organelles involved in cell metabolism and signaling and also a nutrient source for intracellular pathogens [47]. They are highly regulated in macrophages derived from mice infected with *T. cruzi* leading to foamy cell formation and, in some cases, to atherosclerotic lesions [48]. In this work we demonstrate the formation of lipid accumulation immediately after infection, indicating that this is a more general parasite strategy, not only confined to macrophages.

4.3. *Trypanosoma cruzi* Early Infection Induces DNA Damage Response. DDR is a signaling network triggered upon DNA lesions, which coordinates several programs, including DNA repair, cell cycle checkpoints, senescence, or apoptosis [18]. The DDR components in the transduction pathway are sensors of damage, signal transducers, and effectors. DNA damage leads to activation of ataxia-telangiectasia mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) signaling pathways, depending on the nature of the damage. These kinases, in turn, phosphorylate multiple substrates to activate cell cycle regulators and stimulate DNA repair by inducing DNA-repair proteins transcriptionally or posttranscriptionally. In this study, host genes involved in DDR were found to be significantly regulated upon infection with *T. cruzi*. Among them, several genes encoding for enzymes involved in DNA metabolism were induced upon infection, such as DNA polymerases POLK and POLB, DNA helicase RECQL, and DNA glycosylase SMUG1 involved in various types of DNA repair, including mismatch repair, base excision repair, and direct repair. In addition to DNA repair-related genes, we also detected differentially expressed genes that participate in the recruitment of mediators or effectors of DNA repair, such as PML, DOT1L, and RNF8. Interestingly, PML (promyelocytic leukemia protein), involved in chromatin metabolism and DNA repair, has been associated with response to viral infection [49].

On the other hand, a group of DDR related genes which contribute to cell cycle arrest were altered in the early infection (Figure 6). It is remarkable that p21 (CDKN1A) is upregulated in the early infection, suggesting that *T. cruzi* infection triggers a transient cell cycle arrest which may allow the cell to repair the damage. In addition to CDKN1A, other genes detected as differentially expressed have been involved in cell cycle progression regulation at G1, such as CDKN2B, CCNE2, CLK2, GSK3B, PPP2R5C, E2F2, PPM1A, TFDP2, CCNA1, and DCD14A. The rapid induction of DDR leads to the need to develop further studies to confirm whether DNA damage occurs immediately after infection. Besides, taking into account that DDR involves not only gene expression

changes, but also posttranslational modifications, mainly due to the kinase activities of ATM and ATR, a profound evaluation of this response should be performed.

5. Conclusions

In summary, we have demonstrated that the early response to *T. cruzi* infection has a widespread effect on the expression of host genes involved in cellular defense mechanisms, stress responses, and metabolism. The importance of these findings is also relevant by comparing our findings to those previously reported in HeLa cells. The gene expression patterns identified may also provide insights into some of the strategies of initial infection, particularly dissemination: we postulate similar mechanisms of metastatic cancer cells mediated by interleukin 8. Finally, we show activation of DNA damage response, which deserves further studies.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge Gonzalo Greif (IPM) for reanalyzing the results with MeV v4.8, Pilar Zorrilla and Alejandra García (IPM) for technical assistance in microarray and real-time PCR experiments, and Fernando Hernandez (IVIC, Venezuela) for technical assistance in cell cultures. This work was supported by research funds from the Institut Pasteur de Montevideo and fellowships (María Laura Chiribao and Gabriela Libisch) from the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). Adriana Parodi-Talice and Carlos Robello are researchers from the Sistema Nacional de Investigadores (ANII), Montevideo, Uruguay.

References

- [1] F. Y. Maeda, C. Cortez, R. M. Alves, and N. Yoshida, "Mammalian cell invasion by closely related *Trypanosoma* species *T. dionisii* and *T. cruzi*," *Acta Tropica*, vol. 121, no. 2, pp. 141–147, 2012.
- [2] N. M. El-Sayed et al., "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease," *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 409–415, 2005.
- [3] J. A. Atwood III, D. B. Weatherly, T. A. Minning et al., "Microbiology: the *Trypanosoma cruzi* proteome," *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 473–476, 2005.
- [4] K. L. Caradonna and B. A. Burleigh, "Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*," *Advances in Parasitology*, vol. 76, pp. 33–61, 2011.
- [5] C. L. Epting, B. M. Coates, and D. M. Engman, "Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*," *Experimental Parasitology*, vol. 126, no. 3, pp. 283–291, 2010.
- [6] W. E. Paul, *Fundamental Immunology*, 6th edition, 2008.
- [7] N. Garg, V. L. Popov, and J. Papaconstantinou, "Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development," *Biochimica*

- et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*, vol. 1638, no. 2, pp. 106–120, 2003.
- [8] R. C. D. S. Goldenberg, D. A. Iacobas, S. Iacobas et al., “Transcriptomic alterations in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes,” *Microbes and Infection*, vol. 11, no. 14-15, pp. 1140–1149, 2009.
 - [9] P. A. Manque, C. Probst, M. C. S. Pereira et al., “*Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in Cardiomyocytes,” *Infection and Immunity*, vol. 79, no. 5, pp. 1855–1862, 2011.
 - [10] S. Zhang, C. C. Kim, S. Batra, J. H. McKerrow, and P. Loke, “Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 3, article e648, 2010.
 - [11] K. L. Caradonna et al., “Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*,” *Cell Host & Microbe*, vol. 13, no. 1, pp. 108–117, 2013.
 - [12] T. Shigihara, M. Hashimoto, N. Shindo, and T. Aoki, “Transcriptome profile of *Trypanosoma cruzi*-infected cells: simultaneous up- and down-regulation of proliferation inhibitors and promoters,” *Parasitology Research*, vol. 102, no. 4, pp. 715–722, 2008.
 - [13] S. V. De Avalos, I. J. Blader, M. Fisher, J. C. Boothroyd, and B. A. Burleigh, “Immediate/early response to *Trypanosoma cruzi* infection involves minimal modulation of host cell transcription,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 1, pp. 639–644, 2002.
 - [14] V. T. Contreras, T. C. Araujo-Jorge, M. C. Bonaldo et al., “Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media,” *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 83, no. 1, pp. 123–133, 1988.
 - [15] J. A. Costales, J. P. Daily, and B. A. Burleigh, “Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells by comparative mRNA profiling,” *BMC Genomics*, vol. 10, article 252, 2009.
 - [16] K. Matsushima, K. Morishita, T. Yoshimura et al., “Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 167, no. 6, pp. 1883–1893, 1988.
 - [17] R. Wisdom, “Ap-1: one switch for many signals,” *Experimental Cell Research*, vol. 253, no. 1, pp. 180–185, 1999.
 - [18] S. P. Jackson and J. Bartek, “The DNA-damage response in human biology and disease,” *Nature*, vol. 461, no. 7267, pp. 1071–1078, 2009.
 - [19] C. Cavelier, I. Lorenzi, L. Rohrer, and A. von Eckardstein, “Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1,” *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1761, no. 7, pp. 655–666, 2006.
 - [20] M. Digel, R. Ehehalt, W. Stremmel, and J. Füllekrug, “Acyl-CoA synthetases: fatty acid uptake and metabolic channeling,” *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 326, no. 1-2, pp. 23–28, 2009.
 - [21] A. Kihara, “Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders,” *The Journal of Biochemistry*, vol. 152, no. 5, pp. 387–395, 2012.
 - [22] T. Naganuma, Y. Sato, T. Sassa, Y. Ohno, and A. Kihara, “Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7,” *FEBS Letters*, vol. 585, no. 20, pp. 3337–3341, 2011.
 - [23] H. D’Avila, C. G. Freire-de-Lima, N. R. Roque et al., “Host cell lipid bodies triggered by *Trypanosoma cruzi* infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth,” *Journal of Infectious Diseases*, vol. 204, no. 6, pp. 951–961, 2011.
 - [24] Y. M. Zhu and P. J. Woll, “Mitogenic effects of interleukin-8/CXCL8 on cancer cells,” *Future Oncology*, vol. 1, no. 5, pp. 699–704, 2005.
 - [25] D. Gales, C. Clark, U. Manne, and T. Samuel, “The chemokine CXCL8 in carcinogenesis and drug response,” *ISRN Oncology*, vol. 2013, Article ID 859154, 8 pages, 2013.
 - [26] G. Van Zandbergen, N. Hermann, H. Laufs, W. Solbach, and T. Laskay, “Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes,” *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 8, pp. 4177–4184, 2002.
 - [27] T. Laskay, G. van Zandbergen, and W. Solbach, “Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor,” *Immunobiology*, vol. 213, no. 3-4, pp. 183–191, 2008.
 - [28] M. Veenstra and R. M. Ransohoff, “Chemokine receptor CXCR2: physiology regulator and neuroinflammation controller?” *Journal of Neuroimmunology*, vol. 246, no. 1-2, pp. 1–9, 2012.
 - [29] J.-J. Wen, M. Dhiman, E. B. Whorton, and N. J. Garg, “Tissue-specific oxidative imbalance and mitochondrial dysfunction during *Trypanosoma cruzi* infection in mice,” *Microbes and Infection*, vol. 10, no. 10-11, pp. 1201–1209, 2008.
 - [30] J.-J. Wen, G. Vyatkina, and N. Garg, “Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 37, no. 11, pp. 1821–1833, 2004.
 - [31] S. Gupta, M. Dhiman, J.-J. Wen, and N. J. Garg, “ROS Signalling of inflammatory cytokines during *Trypanosoma cruzi* infection,” *Advances in Parasitology*, vol. 76, pp. 153–170, 2011.
 - [32] I. Rahman and W. MacNee, “Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 28, no. 9, pp. 1405–1420, 2000.
 - [33] A. Bowie and L. A. J. O’Neill, “Oxidative stress and nuclear factor- κ B activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 59, no. 1, pp. 13–23, 2000.
 - [34] M. E. Ginn-Pease and R. L. Whisler, “Optimal NF κ B mediated transcriptional responses in Jurkat T cells exposed to oxidative stress are dependent on intracellular glutathione and costimulatory signals,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 226, no. 3, pp. 695–702, 1996.
 - [35] N. D. Perkins, “Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 1, pp. 49–62, 2007.
 - [36] F. S. Machado, H. B. Tanowitz, and A. L. Ribeiro, “Pathogenesis of chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress,” *Journal of the American Heart Association*, vol. 2, no. 5, Article ID e000539, 2013.
 - [37] M. A. Zacks, J.-J. Wen, G. Vyatkina, V. Bhatia, and N. Garg, “An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress,” *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, vol. 77, no. 4, pp. 695–715, 2005.

- [38] X. Ba, S. Gupta, M. Davidson, and N. J. Garg, "Trypanosoma cruzi induces the reactive oxygen species-PARP-1-RelA pathway for up-regulation of cytokine expression in cardiomyocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 15, pp. 11596–11606, 2010.
- [39] F. Nagajyothi, L. M. Weiss, D. L. Silver et al., "Trypanosoma cruzi utilizes the host low Density Lipoprotein receptor in invasion," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 2, article e953, 2011.
- [40] L. A. Campbell, A. W. Lee, M. E. Rosenfeld, and C. C. Kuo, "Chlamydia pneumoniae induces expression of pro-atherogenic factors through activation of the lectin-like oxidized LDL receptor-1," *Pathogens and Disease*, 2013.
- [41] L. A. Campbell, M. Puolakkainen, A. Lee, M. E. Rosenfeld, H. J. Garrigues, and C.-C. Kuo, "Chlamydia pneumoniae binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells," *Microbes and Infection*, vol. 14, no. 1, pp. 43–49, 2012.
- [42] T. Yoshida, N. Koide, I. Mori, H. Ito, and T. Yokochi, "Chlamydia pneumoniae infection enhances lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) expression on human endothelial cells," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 260, no. 1, pp. 17–22, 2006.
- [43] D. Sunnemark, R. A. Harris, J. Frostegård, and A. Örn, "Induction of early atherosclerosis in CBA/J mice by combination of Trypanosoma cruzi infection and a high cholesterol diet," *Atherosclerosis*, vol. 153, no. 2, pp. 273–282, 2000.
- [44] C. M. Anderson and A. Stahl, "SLC27 fatty acid transport proteins," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 34, no. 2-3, pp. 516–528, 2013.
- [45] K. Tamura, A. Makino, F. Hullin-Matsuda et al., "Novel lipogenic enzyme ELOVL7 is involved in prostate cancer growth through saturated long-chain fatty acid metabolism," *Cancer Research*, vol. 69, no. 20, pp. 8133–8140, 2009.
- [46] F. P. Radner et al., "Mutations in CERS3 cause autosomal recessive congenital ichthyosis in humans," *PLoS Genet*, vol. 9, no. 6, Article ID e1003536, 2013.
- [47] M. Stehr, A. A. Elamin, and M. Singh, "Cytosolic lipid inclusions formed during infection by viral and bacterial pathogens," *Microbes and Infection*, vol. 14, no. 13, pp. 1227–1237, 2012.
- [48] N. Kume and T. Kita, "Roles of lectin-like oxidized LDL receptor-1 and its soluble forms in atherogenesis," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 12, no. 4, pp. 419–423, 2001.
- [49] R. D. Everett, "Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response," *Cellular Microbiology*, vol. 8, no. 3, pp. 365–374, 2006.

Transcriptomic analysis reveals that metabolic switch and surface remodeling are key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*

Luisa Berná^{1#}, María Laura Chiribao^{1,2#}, Gonzalo Greif¹, Matias Rodriguez³, Fernando Alvarez-Valin³, Carlos Robello^{1,2*}.

¹Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay

³Sección Biomatemática, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

[#]Equal contribution

*Correspondence: robello@pasteur.edu.uy

Abstract

American trypanosomiasis is a chronic and endemic disease, which affects millions of people. *Trypanosoma cruzi*, its causative agent, has a complex life cycle that involves complex morphological and functional transitions, as well as a variety of environmental conditions. This requires a tight regulation of gene expression, which is achieved mainly by post-transcriptional regulation. In this work we conducted the first RNAseq analysis of the three major life cycle stages of *T. cruzi*, amastigotes, epimastigotes and trypomastigotes. This analysis allowed us to delineate specific transcriptomic profiling for each stage, and also to identify those biological processes of major relevance in each state. Stage specific expression profiling evidenced the plasticity of *T. cruzi* to adapt quickly to the different conditions, with particular focus on membrane remodeling and metabolic shifts along the life cycle. Epimastigotes, which replicate in the gut of insect vector, showed higher expression on genes related to energy metabolism, mainly Krebs cycle, respiratory chain and oxidative phosphorylation related genes, and anabolism related genes associated to nucleotide and steroid biosynthesis; also a general down regulation of surface glycoproteins was seen at this stage. Trypomastigotes, living extracellularly in the bloodstream of mammals, express a plethora of surface proteins and signaling genes involved in invasion and evasion of immune response. Amastigotes mostly express membrane transporters and genes involved in regulation of cell cycle, and also express a specific subset of surface glycoproteins coding genes. In addition, these results allowed to improve the annotation of Dm28c genome, identifying new ORFs and set the stage for

34 construction of networks of co-expression, which can give clues about coded proteins of
35 unknown functions.

36 **Keywords:** Trypanosoma cruzi, Chagas disease, metabolic regulation, surface proteins,
37 RNA-seq

38

39 Introduction

40 *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, a chronic and endemic disease
41 affecting millions of people mainly in America. This protozoan parasite has a complex life cycle
42 involving both vertebrate and invertebrate hosts, and extracellular and intracellular stages
43 (Brener 1973). These environmental switches involve dramatic changes in the physiology of
44 these parasites. In fact, *T. cruzi* has three main stages during its life cycle: trypomastigotes
45 (infective and non-replicative), amastigotes (replicative and intracellular in the vertebrate host),
46 and epimastigotes (replicative and insect-specific) (Brener, 1973; Vickerman 1976).

47 These stages have been defined initially by morphological characteristics (Chagas 1909) and,
48 as expected, they imply changes at the cellular level, including surface composition and energy
49 metabolism. Specifically, while epimastigotes are highly active in catabolism and anabolism
50 related pathways, and potentially use nutrients from different origins (lipids, proteins,
51 sugars)(Cazzulo 1984; Cazzulo 1992), trypomastigotes have low levels of transcription and
52 translation, being specialized in attachment and infection of cells. In turn amastigotes, although
53 metabolically more active than trypomastigotes, do not have the versatility of epimastigotes in
54 response to different nutritional situations (Engel, Franke de Cazzulo et al. 1987), even though
55 very little information is available about amastigote metabolism.

56 Regarding the surface, *T. cruzi* has a dense glycocalyx formed by a large number of GPI-
57 anchored proteins that to a certain extent constitutes an identity hallmark of these parasites
58 (Acosta-Serrano, Almeida et al. 2001). These surface proteins belong to several multigene
59 families, product of gene expansion phenomena, which represents a characteristic feature of *T.*
60 *cruzi*. Their biological relevance relies on the interaction with the immune system, resistance to
61 low pH, antibody clearance, among others (Buscaglia, Campo et al. 2006). Hence these
62 parasites are potentially able to remodel their surface, but large-scale studies of all the surface
63 genes were not performed up to date.

64 These above mentioned changes obviously require a fine regulation of gene expression.
65 However, unlike most eukaryotes, trypanosomes have peculiarities in the genome organization
66 and transcription that will be mentioned here, for further discussion of the results, with special

focus on RNA Polymerase II transcription units. The genome of trypanosomatids is organized in clusters of protein-coding genes, separated by relatively short intergenic regions (Daniels, Gull et al. 2010). With a few exceptions, genes do not contain introns, and the clusters are transcribed as long nuclear polycistronic units, and this particular organization probably explains why only a few numbers of promoters have been found in trypanosomes. Still in the nucleus, polycistronic units are processed becoming mature individual mRNAs, This is achieved by a very particular mechanism involving the coupling of *trans*-splicing and polyadenylation. Indeed, a similar mechanism to that involved in *cis*-splicing, is responsible for the addition of a capped spliced leader sequence (SL RNA) in the 5'UTR of one gene. This process is coupled to the polyadenylation of the 3' end of the gene located upstream on the same polycistronic RNA molecule. As a consequence, a molecule of mature (capped, polyA⁺, transpliced) mRNA is released from the polycistron and exported to the nucleus, where it can be translated. Therefore, in trypanosomes the 5'UTR is the sequence segment located between the SL and the first translated codon, whereas the 3' UTR is defined in the same way than in other eukaryotes. In contrast to bacterial operons, trypanosomatid polycistronic units do not contain genes that are functionally related. Moreover, despite their contiguity in the primary transcript, individual genes from the same transcription unit can show markedly different expression patterns (Vanhamme and Pays 1995). This observation indicates that in trypanosomes regulation of gene expression operates mainly at the post-transcriptional level. In fact, it is widely accepted that mRNA degradation is one the most relevant mechanisms of differential expression in trypanosomes, and that the 3'UTR regions play an important role in controlling RNA stability and hence differential expression (Kramer 2012). However, the exact mechanisms allowing specificity are still unknown. Actually, no consensus sequences have been found in these regions that could explain changes in expression. Very probably its three-dimensionality, and not linearity of RNA is at the basis of pattern recognition.

Most of the basic research on Chagas disease oriented to the characterization of targets for drugs, diagnostics and vaccines, has been focused mainly on key metabolic reactions and surface glycoproteins respectively. However, a systemic and integral landscape of whole expression changes in the main stages of *T. cruzi* is still missing. In this work we present the

first RNAseq characterization of the three main life-cycle stages: amastigotes, epimastigotes and cell-derived trypomastigotes, aiming to identify genes with notorious expression patterns variation and new regulatory mechanisms to shed light into the biology of the parasite, with special focus on energy metabolism and surface remodeling. Furthermore this transcriptome analysis allowed us improving the annotation of Dm28c genome. A systemic view about the features of gene reprogramming along the life cycle of *Trypanosoma cruzi* can be of significant importance for future identification of key molecules to be used in the control of Chagas disease.

Results and discussion

In the present work we have determined and compared the transcriptome profiling of the three main life cycle stages of the parasite *Trypanosoma cruzi*. PolyA⁺ RNA from parasites was purified, and libraries were constructed for amastigotes (A3 and A7), trypomastigotes (T3 and T7) and epimastigotes (E3 and E7), and sequenced by Illumina technology; after filtering for poor quality sequencing scores, we got around 4×10^7 reads for each stage (Table 1). Reads were aligned to the reference genome of *T. cruzi* Dm28c using Bowtie (Langmead, Trapnell et al. 2009), allowing two mismatches for 36nt reads and three mismatches for 72nt reads. The amount of reads that were of good quality and also aligned to reference genome for each library are presented in Table 1. As shown in this table around 60% of the reads map into the reference genome, which represents a significant value taking into account the still incomplete state of the Dm28c genome assembly.

Table 1 RNA-seq mapping statistics.

Library	Read length	Total reads	Aligned reads	% Aligned reads	read counts in CDS*	% read counts in CDS*
A3	36	37.972.908	21.083.527	55,5	10.150.097	48,1
A7	72	6.011.870	2.644.677	44,0	1.314.640	49,7
T3	36	37.549.496	24.880.138	66,3	10.941.002	44,0
T7	72	2.976.919	1.604.848	53,9	716.431	44,6
E3	36	35.740.671	24.024.322	67,2	9.482.211	39,5
E7	72	8.540.435	5.496.063	64,4	2.192.983	39,9

* CDS extended 200bp at both sides

A: amastigotes, T: tryomastigotes, E: epimastigotes

In order to determine and quantify the transcript levels of each gene in the different stages, reads were assigned to coding sequences (CDS) using Enhanced Read Analysis of Gene Expression; ERANGE (Mortazavi, Williams et al. 2008). Basically ERANGE assigns reads that map uniquely in the genome. For those reads matching equally to two or more sites, this program uses the extended coding sequences (we have chosen 200nt at both sides of the CDS, see Methods) assigning them to their most likely site. Total reads counts are presented in Table 1. It is noteworthy that 50 % of the mapped reads do not map in CDS but in other regions of the genome (Table 1). Checking the density (sequencing depth) of mapped reads by visual inspection, it is immediately apparent that most of them map on UTRs regions, predominantly 3'UTR (data not shown). It should be mentioned that *T. cruzi* UTR lengths vary accordingly to the gene size, and have been estimated from experimentally mapped genes to range from 10-400 bp for 5'UTR and 17-2800 bp for 3'UTR (Brandao and Jiang 2009) being 3'UTR 2-3 times longer than 5'UTR (Ziccardi and Brandao 2011). This result reinforces previous findings showing the relevance of 3' UTRs in the regulation of gene expression ((Nozaki and Cross 1995; Weston, La Flamme et al. 1999; Coughlin, Teixeira et al. 2000; Di Noia, D'Orso et al. 2000; da Silva, Bartholomeu et al. 2006).

A second point that needs to be considered here is that most of the sequenced *T. cruzi* genomes are still in a "draft-like" form, mainly due to the high number of repetitive sequences. Indeed, *T. cruzi* consists of more than 50% repeats that include surface molecule genes and several other gene families, as well as the poorly characterized retroelements (El-Sayed, Myler et al. 2005; Arner, Kindlund et al. 2007). However, we cannot discard that many assembled regions are not completely annotated. In this regard the RNA-seq data can be used to help detect novel transcripts and new genes. In the following sections we will focus our analysis on surface genes, metabolic pathways and the annotation of potentially new genes.

Highest expressed genes

Analysis of 500 most expressed genes revealed that 277 genes are common to epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes. Gene ontology enrichment showed that these genes are

related to microtubule movement, chromosome organization, DNA packaging and conformation change, response to stress, cell cycle progress, chromatin assembly among others (Table 2 and Additional file 1). These results suggest the relevance of epigenetic regulation in *T. cruzi* life cycle development. Also amino acid activation (synthesis of aminoacyl-tRNAs) and other proteins related to translation machinery appear to be relevant in driving changes through the cycle (Additional file 1 and 8). Metabolic pathway analysis of common highly expressed genes showed that aminoacyl-tRNA biosynthesis, purine metabolism, glycolysis and porphyrin metabolism are the most important. Protein synthesis, folding and degradation pathways were also very represented in this group with many ubiquitin-proteasome system genes, translation factors and chaperones being greatly expressed. It is noteworthy that some aminoacyl tRNA synthetases show high expression profiles: glutamyl, isoleucyl, prolyl and valyl tRNA. We cannot discard that these enzymes might have additional domains and roles (Additional file 8). It is known that leucyl tRNA synthetase participates as a sensor that mediates amino acid dependent mTORC1 activation (Han, Jeong et al. 2012) and glutamyl tRNA synthetase participates in the antiapoptotic activity of glutamine by its interaction with ASK1 (Ko, Kim et al. 2001). Due to the relevance of proline in parasite differentiation it is tempting to speculate that prolyl tRNA synthetase might also be involved in sensing and/or regulation roles. Activation of translation, expression of aminoacyl tRNA synthetases, folding and ubiquitin proteasome expression suggest that as well as epigenetic control, protein remodeling also plays a relevant role in parasite stage transition.

168

Table 2 Gene Ontology enrichment of commonly highest expressed genes

GO term	% genes present	Fold enrichment	p value
microtubule-based movement	21.0	5.39	2.73e-6
cellular component movement	20.3	5.22	3.72e-6
microtubule-based process	18.3	4.71	1.01e-5
chromosome organization	35.3	9.08	1.46e-4
DNA conformation change	31.3	8.04	8.54e-4
organelle organization	19.4	5.0	9.16e-4
DNA packaging	44.4	11.43	1.03e-3
cellular component organization	12.3	3.17	5.39e-3
cellular component organization at cellular level	12.7	3.27	7.75e-3
cellular component organization or biogenesis	10.6	2.72	7.86e-3
chromosome condensation	100.0	25.72	7.94e-3
sister chromatid cohesion	100.0	25.72	7.94e-3
chromosome segregation	100.0	25.72	7.94e-3
response to stress	12.1	3.1	9.99e-3

169

170

171 Differential expression of *T. cruzi* surface genes

172 The surface of *T. cruzi* is covered by a dense glycocalix and its composition is characteristic of
 173 each differentiation stage, being most of these glycoproteins attached to the plasma membrane
 174 by a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor (de Lederkremer and Agusti 2009). Most of the
 175 surface proteins belong to multigene families and are involved in the interaction with their hosts
 176 (De Pablos and Osuna 2012)

177 Several studies have been performed in the different protein groups aimed to shed light on their
 178 structure, post-translational modifications, their role in the infection and prevalence and the
 179 importance as markers or possible drug targets,(Acosta-Serrano, Cole et al. 2000; Buscaglia,
 180 Campo et al. 2006; Kawashita, da Silva et al. 2009; Freitas, Santos et al. 2011; De Pablos and
 181 Osuna 2012; De Pablos and Osuna 2012). The first *T. cruzi* genome studies have given a more
 182 integrative view of the complexity of these expanded families, and have even allowed the
 183 identification of a new protein family named Mucin-associated surface proteins ((El-Sayed,
 184 Myler et al. 2005; Franzén, Ochaya et al. 2011; Franzén, Talavera-López et al. 2012; Grisard,
 185 Teixeira et al. 2014). The main multigene families correspond to trans-sialidases (TS), mucins
 186 (MUC), mucin-associated surface proteins (MASP), dispersed gene family-1 (DGF-1) and

metalloproteases (GP63). In order to further analyze these families and their expression, we first performed a genomic analysis using public data available in the Tritryp database that include six genomes. Table 3 shows the number of members of these multigene families (including pseudogenes). As it can be observed, there are significant differences in the multigene families content in different strains. This variation in the membrane composition can constitute a characteristic of the different phylogenetic groups. We further investigated the transcript levels of these gene families during the life cycle of the parasite, and we found that 560 genes encoding surface proteins are differentially expressed, most of them (499) up regulated in trypomastigotes (Table 3 and Additional file 2). This result is in line with previous reports indicating that most of the members of the families are relevant in the infective stages of the parasite (De Pablos and Osuna 2012). However, a more in depth analysis of surface multigene families show that all of them have stage specific genes and some of them are not expressed at all in trypomastigotes (Figure 1).

Table 3 Membrane component in *T. cruzi* and differentially expressed in Dm28c

	TS	MASP	mucin	DGF-1	GP63	CRP
Brener	419	345	230	205	93	1
Non-esmeraldo	579	501	321	186	160	2
Esmeraldo-like	526	531	339	174	172	0
marinkellei	841	337	69	709	129	15
Sylvio	1112	249	76	984	126	4
Dm28c	659	311	116	69	60	13
DEG	295 (45%)	205 (66%)	25 (22%)	1 (1%)	26 (43%)	9 (69%)
Upregulated in trypomastigote	270 (92%)	198 (97%)	12 (48%)	0 (0%)	10 (38%)	9 (100%)

Trans-sialidases TSs were described as the largest gene expansion phenomena in the CL Brener strain of *T. cruzi* (El-Sayed, Myler et al. 2005), and as we show in Table 3, the analysis of all currently available genomes confirms that initial finding, indicating that it constitutes a general phenomena in *T. cruzi*, independently of the phylogenetic origin. An interesting observation from the analysis of TS expression is that all of them are regulated during the life cycle of the parasite (Figure 1): 268 genes (80%) are up regulated in trypomastigotes, but 33 genes are almost exclusively expressed amastigotes, whereas 31 genes are up regulated in

epimastigotes (asterisks in Figure 1). It has been well established the relevance of TSs in the infective stages of *T. cruzi*, due to their participation in adhesion and invasion of host cells through different functions. In the first place, *T. cruzi* is unable to synthesize sialic acid, and rely for its acquisition the surface on TSs, which are capable of transferring sialic acid residues from host sialoglycoconjugates to parasite mucins (Schenkman, Jiang et al. 1991; Ferrero-García, Trombetta et al. 1993; Frasch 2000). Secondly, these proteins participate in the recognition process through binding to specific receptors (laminin, Trk, among others), and it has been demonstrated that the different variants could explain at least in part the organ tropism of these parasites (Magdesian, Giordano et al. 2001; Tonelli, Giordano et al. 2010). Finally, non-infective epimastigotes also express functional trans-sialidases, and, despite their role is unclear, it is accepted that they can participate in insect-parasite interactions and metacyclogenesis (Chaves, Briones et al. 1993).

The described functions of TSs are clearly related to invasion, escape from parasitophorous vacuole, modulation of immune response and apoptosis and hence the predominance of TSs in trypomastigotes, but some TS members are specifically expressed in amastigotes and epimastigotes. To analyze the characteristics of these groups, we conducted comparisons among the stage-specific up regulated TSs, namely those exclusively expressed in epimastigotes (eTS), or in trypomastigotes (tTS) or in amastigotes (aTS). We compared among these groups of proteins basic features such as predicted GPI anchor addition signal and estimated molecular weight. As figure 2 shows, eTS and aTS are smaller than tTS, the mean predicted molecular weight were 27,7 kDa for eTS, 55,3 kDa for aTS and 67,6 kDa for tTS. Protein characterization showed that eTS are around 60 kDa and tTS molecular weights ranging from 120 to 240 kDa (Schenkman, Jiang et al. 1991; Briones, Egima et al. 1995). These differences may be attributed to oligomer formation but also to glycosylation, which are not included in our prediction. In addition, analysis of GPI anchor prediction revealed that none of eTS contain predicted GPI anchor sites (100%), 43% of aTS contain predicted GPI sites whereas 60.6% of tTS are probably GPI anchored. These results support previous reports showing that only 70% of GPI anchored trans-sialidase are released after phospholipase C treatment in trypomastigotes (Rosenberg, Prioli et al. 1991)

Complement regulatory proteins constitute a subgroup belonging to the TS superfamily that were analyzed separately for two reasons: first, their relevant role restricting the activation of the complement pathway and the lysis of the parasite (Norris 1998) (a resistance function that in *Leishmania* is mediated by one group of GP63 proteases, (Grandgenett, Coughlin et al. 2000)) and second because we found that, like Sylvio, Dm28c has 13 CRP genes whereas in other strains they are single (or few) copy genes (Table 3). Our analysis showed that all CRP genes were significantly over expressed in trypomastigotes, and even more, 70% were almost exclusively expressed in trypomastigotes (Figure 1 and Additional file 2). It was previously reported that CRPs are expressed on metacyclic and cell derived trypomastigotes surface, but they are undetectable in epimastigotes and amastigotes (Norris, Harth et al. 1989). Our results show a correlation between protein and mRNA levels for this gene family, and also confirm their specificity for trypomastigotes as expected considering their function. Further studies comparing complement-mediated lysis between other *T. cruzi* strains can give clues about correlation between this group of genes, complement resistance and infectivity.

Mucin-associated surface protein. Being the second largest multigene family in *T. cruzi*, MASPs were described for the first time after sequencing of *T. cruzi* genome (El-Sayed, Myler et al. 2005), and the precise function and expression of them remains unclear. Our results show that 97% of MASP genes were up-regulated in trypomastigotes, which confirm previous studies obtained using 3'UTR as a probe in Northern blot experiments in the CLBrener strain (Bartholomeu, Cerqueira et al. 2009). However, a discrete number of genes were found as differentially up-regulated specifically in amastigotes or epimastigotes (Figure 1 and Additional file 2). Differences in these genes deserve further investigation, which can help to unravel the precise function of MASP family components.

Surface mucins. MUCs, also named mucin-like proteins, are the major component of the *T. cruzi* surface. They play different roles according to the stage and environment; in epimastigotes they are smaller, more conserved and participate in the adhesion to the perimicrovillar membrane in the insect intestine. They also confer protection against proteolysis (Buscaglia, Campo et al. 2006). Mucins expressed in trypomastigotes have high glycan content and diversity, higher molecular weights, and their roles are related to attachment and

penetration as well as immune evasion. Our analysis do not reveal differentially expressed mucin genes (considering fold change greater than two and $FDR < 0.05$) in the different stages, although the great majority of them are more expressed in trypomastigotes (Figure 1). In fact all TcMUCI (19 genes) and 52 of 72 TcMUCII are higher expressed in trypomastigotes. On one hand, the fact that most of the TcMUCII are expressed highly in trypomastigotes is in agreement with previous experiments showing that this subgroup is preferably mucin at this stage (Buscaglia, Campo et al. 2006). On the other, the highest expressed mucins in amastigotes are not TcMUCI but TcMUCII, in disagreement with previous immuno fluorescence experiments showing that TcMUCI as predominant in this stage (Buscaglia, Campo et al. 2006). Two facts are worth stressing: first, only 19 genes have been identified in Dm28c so far (a reduced number in comparison with other available genomes), so we cannot rule out the possibility of not being appreciating the full picture. Second, all TcMUCI genes have a moderate expression, lower in average of that of TcMUCII for all stages.

Finally, there is also a group of 23 genes that drew our attention because they present very low or almost no expression in all three stages. These results make a definite contribution to strengthening our knowledge base in the mucin's expression and so in the composition of *T. cruzi* surface at different stages.

GP63. GP63 are surface GPI anchored metalloproteases present in *Leishmania spp.*, African trypanosomes and *T. cruzi* (Cuevas, Cazzulo et al. 2003; LaCount, Gruszynski et al. 2003). In *Leishmania* species GP63 proteins and their coding genes have been extensively studied (evolution, organization of multigene family and its role in invasion)(Yao, Donelson et al. 2003). However in *T. cruzi* little is known about these genes. As it is clear from Table 3, most available genomes of *T. cruzi* have about 170 genes per haploid genome, but in Dm28c there are only 60 annotated GP63 genes. The expression analysis of these genes allowed us to divide them into two groups: those that were found to be barely expressed at all stages of the parasite (50%), and another group of genes that are differentially expressed (Figure 1 and Additional file 2). This latter, in turn, can be divided into two sub-groups: a first one significantly up-regulated in trypomastigotes, and a second subgroup up-regulated in amastigotes (containing 17 and 9 genes respectively). This suggests a fine regulation of the steady state levels of their mRNAs.

Grandgenett and collaborators have suggested dividing the family in two categories according to their expression in different stages and the length of their 3'UTRs (Grandgenett, Coughlin et al. 2000). Subsequently, Cuevas and co-workers defined again two subgroups: Tcgp63-I that is widely expressed and Tcgp63-II that is scarcely detected in Northern blot analyses (Cuevas, Cazzulo et al. 2003). Our results, which are in line with these previous works, give now a more complete view of the expression pattern of all the GP63 family, indicating a relevant role in the mammal stages of the parasite.

Due to the relevance of these regions in the regulation of stage specific expression (Grandgenett, Coughlin et al. 2000), and taking into account the differences in sequence and length of the 3'UTR we further investigated the GP63 genes and their 3'UTRs. We first conducted a phylogenetic analysis of the amino acid sequences. Thus, we could observe that all DEG GP63 in amastigotes clustered together and the same was true for GP63 genes that were up regulated in trypomastigote with the exception of 3 sequences (Additional file 3). More interesting though, is the analysis of the 3'UTR which shows three groups of sequences clearly differentiated: those that belong to isoforms highly expressed in amastigotes, those associated to genes highly expressed in trypomastigotes and those associated to the group of genes with almost no expression in any stage of life cycle (Figure 3). This result stresses the relevance of 3'UTR in post transcriptional regulation. Whether this is due to the presence of sequences or motives that either stabilize or degrade GP63 mRNA differentially during life cycle is uncertain. Further work will be necessary to identify mRNA-conserved motives in these genes and RNA binding proteins or small RNAs responsible for this tight regulation.

Dispersed gene family 1. Located in sub-telomeric regions, this group of proteins is greatly expanded in CLBrener strain where they are divided in at least 3 groups (Kawashita, da Silva et al. 2009). However, the first aspect that attracted our attention is that this family is its reduction in the Dm28c strain, which contains only 69 copies (Table 3). Taking into consideration that several genes appear to be incomplete (since they exhibit a reduction in length to less than 3000 bp, when the estimated size is around 10kb) the low number of DGF-1 genes in Dm28c could be the consequence of the draft condition of the genome assembly. Previous studies detected DGF-1 gene expression in different stages and also proteomic analyses find DGF-1

proteins in the parasite surface (Atwood, Minning et al. 2006; Kawashita, da Silva et al. 2009). Our results do not show differential expression of these genes among the different three stages analyzed, but it should be pointed out that there is a group of DGF-1 genes that are almost not expressed. Nevertheless these results deserve further investigation because the incomplete annotation of this group could lead to erroneous conclusions.

Our results illustrate the stage specific membrane composition and the surface remodeling during stage transitions. Figure 4 summarizes these general findings: panel A shows the expression levels of each gene belonging to surface multigene families in the different stages and highlights the stage-specific genes. Panel B shows a general picture of expression of these families, where total read counts of each family in the stages are represented.

Metabolic switch through *T. cruzi* life cycle.

Oxidative metabolism. We have found that genes belonging to Krebs cycle, respiratory chain and oxidative phosphorylation, were significantly up regulated in epimastigotes, suggesting an enhanced respiratory activity at this stage (Figure 5A). However expression of genes related to respiration was detected in all stages. Analysis of respiratory chain genes showed very low expression of complex I associated components (NADH dehydrogenase subunit, NADH-ubiquinone oxidoreductase) in all samples (Additional file 4). This result supports the notion that complex I is not very active in *T. cruzi* as was suggested previously (Carranza, Kowaltowski et al. 2009). On the other hand, the relevance of succinate-dependent respiration was evidenced here by the up regulation of NADH dependent fumarate reductase in epimastigotes, which generates succinate as the main source of electrons in the respiratory chain (Denicola-Seoane, Rubbo et al. 1992). The increase in oxidative metabolism in epimastigotes is in concordance with its high anabolic profile, which suggests that in this stage synthesis of macromolecules and particularly steroids is favored.

Regarding the increase in respiration related genes, we wondered if the expression of antioxidant enzymes and NADPH production coding genes were also upregulated, as a strategy of avoiding oxidative damage. Analysis of antioxidant genes also showed a general upregulation of many genes that participates in antioxidant defenses in epimastigotes

(trypanothione reductase, GPX, and tryparedoxin peroxidase) that could play a role against reactive oxygen species produced by high respiratory chain activity (Figure 5B and Additional file 5)). In contrast, ascorbate dependent peroxidase (APX) is upregulated in mammalian stages (trypomastigotes and amastigotes). APX uses ascorbate as electron donor (Logan, Taylor et al. 2007), and it has been proposed that in both stages *T. cruzi* is able to synthesize this vitamin (Logan, Taylor et al. 2007). In this context, the down regulation of APX in epimastigotes might reflect the inefficiency in ascorbate synthesis and/or reduction in this stage. The reduced levels of APX mRNA genes is also in line with the empirical observation that ascorbic acid content in epimastigotes is between 1,6 and 3,6 times lower than trypomastigotes (Clark, Albrecht et al. 1994).

Concerning the expression of antioxidant genes, pentose phosphate pathway genes were also upregulated in epimastigotes (Figure 5C and Additional file 7), suggesting a greater production of NADPH, which acts as an electron donor in detoxifying reactions.

Another remarkable point is that enzymes for fermentation (acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase) were highly up regulated in epimastigotes. These results show that during this stage of life cycle the parasites can be adapted to different metabolic conditions, particularly to different oxygen conditions for ATP production.

Lipid Metabolism. Lipids comprise a variety of compounds that play different roles in cells: membrane structure and fluidity (phospholipids and steroids), energy production (fatty acids), and signaling (phospholipids). Analysis of genes related to lipid metabolism in *T. cruzi* main stages showed significant differences in lipid metabolism related genes. Both epimastigotes and amastigotes (compared to non-dividing trypomastigotes) up regulate key genes involved in phospholipid and sterol biosynthesis (Figure 6 and Additional file 6)

Comparison of genes related to lipid synthesis in amastigotes and epimastigotes revealed that the former not only have higher mRNA levels of genes involved in phospholipid synthesis (phosphatidic acid phosphatase, choline ethanolamine kinase) but also of desaturases which allow the generation of polyunsaturated fatty acids that maintain membrane fluidity under variable environment (Additional file 6).

Concerning sterol biosynthesis pathways it was demonstrated that in amastigotes it is similar to epimastigotes but simpler, being cholesterol (probably derived from the host) up to 80% in

weight of total sterols (Liendo, Visbal et al. 1999). Analysis of sterol synthesis genes showed an up regulation in most genes of this pathway in epimastigotes (Figure 6). This may constitute an advantage due to the variable temperature in the insect host and the subsequent requirement to regulate membrane fluidity. In this sense, it was shown that epimastigotes have the ability to rapidly adapt and remodel their lipid content in response to temperature changes (Florin-Christensen, Florin-Christensen et al. 1997).

We have also analyzed the expression of genes related to catabolism of fatty acids and found that all stages have similar levels of mRNAs encoding beta oxidation enzymes, although some genes relevant for activation and transport of fatty acids exhibited increased mRNA levels in amastigotes and epimastigotes (fatty acyl CoA synthase, carnitine O- acyl transferase). Atwood and co-workers (2005) suggested a shift from carbohydrate to fatty acid catabolism in the transition of trypomastigotes to amastigotes, on the basis of proteomic data that showed the presence of β oxidation enzymes as well as Krebs cycle intermediates. In contrast, metabolic studies confirm that amastigotes can use glucose as a carbon source generating acetate, glycerol and pyruvate (Sanchez-Moreno, Fernandez-Becerra et al. 1995). It is important to note that metabolic, transcriptomic and proteomic studies had been carried out using *in vitro* approaches, sometimes differing from real physiological and environmental conditions. Our data shows that epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes express high levels of β oxidation related genes, but some of them like acyl CoA dehydrogenase, enoil CoA isomerase are up regulated in epimastigotes (Additional file 6)

Glucose catabolism. Trypomastigotes are present in the blood of their mammalian host, where glucose is abundant; amastigotes reside in the cytoplasm of mammalian cells where free glucose is scarce; and epimastigotes live in the digestive tract of the insect (an amino acid rich medium), which has sources of free glucose during or immediately after bloodmeals. The transcriptomic profiling of genes encoding glycolytic enzymes showed that all of them are expressed, but epimastigotes present higher mRNA levels of hexokinase, phosphofructokinase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and enolase than trypomastigotes and amastigotes (Figure 7 and Additional file 7). Comparison of normalized mRNA levels

(ncounts/Kb) showed significant differences between the genes in the same pathway, (Figure 7). An overview of Figure 7 shows that the most highly expressed glycolytic genes are in the extremes of the graphics, that is, in the initial and final steps of glycolysis. These are the most relevant enzymes since they catalyze either the points of regulation of the pathway and/or reactions related to the ATP production. It is well known that intermediate reactions depend on the availability of substrates, and they do not need to have high levels of expression, this is the case of genes 4, 6, 7 and 9 (Figure 7). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) constitute an exception since their level of transcription is higher, but it should be noted that these gene encode cytosolic, instead of glycosomal enzyme and probably high concentrations are required due to the lack of compartmentalization. On the other hand the GAPDH reaction is responsible for the first "high energy" intermediate formation and then, they are a hub for ensuring metabolic flux of the pathway. In summary, although epimastigotes present higher level of some key glycolytic genes, all the stages are prepared for glucose degradation. Additionally we cannot discard that these differences in mRNA levels could also be a strategy for glycolysis regulation under different stimuli like hypoxia or glucose availability. This kind of regulation has been observed in yeast (Daran-Lapujade, Rossell et al. 2007), where posttranscriptional regulation play major roles in modulating metabolism.

A particular highlight of our results is that in amastigotes present a drastic reduction of hexokinase (HK) mRNA levels (almost 7 and 3 times respect to epimastigotes and trypomastigotes respectively, see Figure 7). It has been well established that amastigotes use mainly amino acids as primary source of energy (Silber, Colli et al. 2005), and the drastic down regulation of HK expression could imply a reduction of glycolysis. However, the expression of the other enzymes does not undergo the same change, suggesting that the pathway is active at this stage. In this sense we postulate that glycolysis can go on in amastigotes by using directly hexose phosphates as substrates without free glucose uptake. In this context it should be noted that, as mentioned above, amastigotes express high levels of genes related to pentose pathway, including those ones coding for the non-oxidative phase of the pathway (Figure 5). These enzymes are responsible for the interconversion of monosaccharide-phosphates from 3 to 7 C, then generating hexose phosphates as substrates for glycolysis.

Finally we have found that genes encoding enzymes necessary for fermentation (acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase) were highly up regulated in epimastigotes. These results show that they are adapted to different metabolic conditions, as well as to different oxygen conditions for ATP production. It is known that trypanosomatids produce and excrete reduced fuels not only in anaerobiosis but also in the presence of oxygen (Cazzulo 1992). Interestingly, Sanchez-Moreno and coworkers have showed that epimastigotes but not amastigotes, release ethanol to the media using glucose as a carbon source (Sanchez-Moreno, Fernandez-Becerra et al. 1995), which is in line with our findings.

Protein and amino acid metabolism

Protein synthesis and degradation plays important roles in parasites, which suffer morphological changes and nutritional stresses through their life cycle. Synthesis of new specialized proteins and glycoproteins is necessary for adaptation and survival in each stage. Furthermore, proteins and amino acids can be used as major carbon sources for ATP production depending on the stage and/or the environment (Cazzulo 1984).

In *T. cruzi*, amino acid catabolism is very relevant in proliferative stages, amastigotes use amino acids for energy production and epimastigotes also use amino acids when glucose is not available (Bringaud, Riviere et al. 2006). In addition, some amino acids like arginine and proline play additional roles like energy store and differentiation respectively (Silber, Colli et al. 2005). Among amino acids, proline has an outstanding role promoting the differentiation of intracellular forms (epimastigotes-like to trypomastigotes) (Tonelli, Silber et al. 2004) as well as in metacyclogenesis (Homsy, Granger et al. 1989).

Our results emphasize the significance of amino acids in *T. cruzi* biology and metabolism as indicated by the high expression of several amino acid permeases and transporters in epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes. Our transcriptomic analysis revealed that each stage presents specific highly expressed amino acid transporters, even trypomastigotes. Nevertheless most transporters were up regulated in amastigotes and epimastigotes,

suggesting that amino acid metabolism is more relevant in proliferative stages than in trypomastigotes (Figure 8 and Additional file 8).

It has been demonstrated that epimastigotes can metabolize asparagine, aspartate, glutamine, glutamate and branched amino acids like valine, leucine and proline, and their oxidation converges in aspartate and glutamate. Glutamate can participate as substrate of transaminases or deaminases and enter the Krebs cycle (Silber, Colli et al. 2005). To check these aspects we looked for genes involved in valine, leucine and isoleucine degradation and their expression through the life cycle. Our data agree with the idea that catabolism of these amino acids is increased in epimastigotes since most genes of this pathway were up regulated in this stage. It should be pointed out that one of the most important enzymes involved in branched amino acid degradation, the oxoisovalerate dehydrogenase complex, is also upregulated in amastigotes (Figure 8, Additional file 8).

The amino group of glutamate can be transferred to pyruvate by transaminases (alanine aminotransferase or tyrosine aminotransferase) or alternatively transferred to water by glutamate dehydrogenases, releasing NH_3 . In this context we looked for glutamate dehydrogenases coding genes (NADP⁺ and NAD⁺ dependent) and tyrosine and alanine aminotransferases and it was found that both glutamate dehydrogenases were upregulated in epimastigotes, in particular NADP⁺ dependent glutamate dehydrogenase mRNA levels were increased 10 fold in this stage (Figure 8 and Additional file 8). All these results strongly support the idea that amino acid and nitrogen metabolism is enhanced in epimastigotes due to the scarcity of carbohydrates and the abundance of proline during this stage. In this sense, a general down regulation of processes related to amino acid metabolism and transport was observed in trypomastigotes, supporting the idea that amino acids are not the preferred fuel in this stage (Bringaud, Riviere et al. 2006).

As mentioned above, arginine participates in energy storage through a reaction catalyzed by arginine kinase. This reaction generates phosphoarginine, which serves as an ATP, and phosphate reservoir and supports burst of cellular activity during the life cycle (Alonso, Pereira et al. 2001). Our results show that this gene is significantly up regulated in epimastigotes and

trypomastigotes; and this might reflect the fact that amastigotes have a constant supply of glucose and amino acids and therefore do not need such energy storage. Another explanation is that arginine kinase activity was not directly correlated with mRNA levels, a result already shown for epimastigotes (Alonso, Pereira et al. 2001).

Finally, analysis of proteasomal expression during the cycle showed that 24 genes related to proteasome subunits are highly expressed during the cycle (Additional file 8), this is not surprising since parasites undergo radical morphological changes which are carefully controlled by proteasome mediated proteolysis (Munoz, San Francisco et al. 2015).

Annotation of new genes

During the analysis we found that some genes were not annotated in the DM28C strain. Additionally the visual inspection of mapped reads evidences transcriptional activity in regions that were annotated as intergenic and also encompass relatively long (>300 nt) open reading frames (ORFs). These three facts led us to look for possible non annotated genes. For this purpose we assembled the transcriptome including all reads from the different libraries. From this assembly we identified 9521 novel transcripts (not coincident with the known annotation) containing 1400 ORFs regions with a minimum length of 300pb. These ORFs were subsequently validated by HMM and Blast searches against public databases giving a total of 858 new possible coding sequences. These predictions correspond to genes or gene segments that were not annotated in the Dm28c strain. To identify ORFs with higher chances of corresponding to complete CDSs (within this population of non annotated genes) we decided to use a more stringent criterion in this annotation step and kept only those ORFs that align with an annotated protein entry with the following requirements: minimum alignment identity: 60%, minimum query alignment length 60% and, minimum subject alignment length 60%. With this procedure we identified 247 putative proteins that were not previously annotated in Dm28c that mostly correspond to hypothetical proteins, but also we identified several surface components (TS, mucins, MASP, etc), retrotransposon hot spot proteins, among other genes (see Additional file 9). In particular we found the tryparedoxin 1 (TXN I) gene almost identical (99.3% identity) to the *T. cruzi* tryparedoxin CAC85916.1. Overall these results illustrate the importance of continuing

to progress in the annotation process combining different sources of data and manual curation (Additional file 9).

The expression analyses presented here were further compared to known and particular protein expression profiles (Additional file 10). These group of genes are: i) flagellum associated genes down-regulated in amastigote which lack flagella; ii) genes related to conversion of histidine to glutamate up-regulated in epimastigotes allowing to this stage to take advantage of the abundance of histidine in the gut of its insect vector (Parodi-Talice, Duran et al. 2004); iii) mucins up regulated in trypomastigotes, being TcMUC II predominant (70%) over TcMUC I (Additional file 10) (Buscaglia, Campo et al. 2006). Although a correlation between mRNA and protein levels cannot be taken as granted, in the above mentioned examples this correlation among is apparent. The very existence of this correlation implies that the applied methodology was adequate and gives robustness to our results.

Conclusions

In this work we conducted a RNA-seq analysis in *Trypanosoma cruzi*, a species of great medical importance since is the causative agent of Chagas disease. We have sequenced RNA popultions from the three stages of the life cycle of the parasite using the Illumina technology. The use of this technology in combination with computational tools was used to analyze several aspects in this species which in turn allowed us to draw some conclusions by means of comparative analysis along the life cycle of *T. cruzi*.

One first aspect to be emphasized is the correlation between the previously described high metabolic activity in epimastigotes, and the patterns of gene expression of this stage. Metabolic pathway analysis of highly expressed genes in epimastigotes are related to ATP production like Krebs cycle, pyruvate metabolism, respiratory chain, oxidative phosphorylation, nitrogen metabolism; also biosynthetic pathways related genes were upregulated at this stage, being the most important steroid biosynthesis. Gene ontology analysis confirms the pathway enrichment analysis, since the Biological process related to ATP biosynthesis, carbohydrate and amino acid metabolic catabolism are the most important in epimastigotes.

In amastigotes, (intracellular replicative forms) the highest expressed genes are related to regulation of cell cycle, protein and amino acid catabolic processes, adhesion and signaling. Adhesion includes the expression of many surface proteins involved in invasion like stage specific trans-sialidases, GP63, and MASPs. The high level expression of transporters, mainly for amino acids, clearly shows the use of host cytoplasmic metabolites at this stage.

Trypomastigotes (non replicative and infective form), exhibit a predominance of surface proteins genes, being more than 50% of the transcripts coding for trans-sialidases, MASPs, GP63, mucins and complement regulatory proteins. Biological process analysis of these genes revealed that cell adhesion, microtubule-based flagellum, peptidase, signal transducer activity and calmodulin binding are the most relevant ones, in agreement with the specialization of trypomastotes in movement, adhesion, invasion and signaling.

Finally, by analyzing the whole assembled transcriptome obtained in this study, we identified 1400 ORF regions with a minimum length of 300pb that eventually correspond to 858 new coding sequences. By using stringent matching conditions, 247 proteins were identified as non annotated in the Dm28c genome.

In summary, transcriptome profiling of the main three developmental stages of *Trypanosoma cruzi* has showed genes and processes related to each stage, and allow one to conclude that surface remodeling and metabolic switches are at the basis of differentiation

Material & Methods

Parasites

Epimastigotes were grown in liver infusion tryptose medium (LIT) supplemented with 10 % heat inactivated fetal bovine serum (FBS) at 28°C (Robello, Navarro et al. 1997). Trypomastigotes were collected from supernatants of infected monolayers of Vero cells DMEM medium at 37°C under 5% CO₂

Extracellular amastigotes were obtained by incubating trypomastigotes recently released from the cells in DMEM medium at 37°C under 5% CO₂ for 24 h as previously described (Chiribao, Libisch et al. 2012).

RNA purification and quality control

Total RNA was isolated with phenol/chloroform as described by the manufacturer (Tri Reagent, Sigma-Aldrich, USA), which was then purified with Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare) according to manufacturer's protocol. Processed samples were quantified in a Qubit (Invitrogen), exhibiting a high content of total RNA and a good quality without degradation, according to the RIN (RNA integrity number) values obtained from a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), which were all above 8.

RNA-seq library construction, quality control and sequencing

Two libraries (biological replicates) were constructed for each *T. cruzi* stage. Directional RNAseq Illumina libraries were constructed, and quantified using Kappa Library Quantification Kit (Kapa, Biosystems) and Qubit (Invitrogen). Quality control of the length of the library was done with DNA 1000 kit, Bioanalyzer. Finally, 15 pM of the libraries (mean length=350nt), were clustered on an Illumina Single Read Flow Cell in cBot (Illumina). Single read 72 and 36 cycles of sequencing was performed on GAlx instrument with Illumina Sequencing kits (TruSeq SBS v5-GA kit, Illumina).

Bioinformatics and data analysis

For each stage, two libraries were generated of 36 and 72 bp each. Reads were filtered for ribosomal RNA, and a minimum of quality phred score of 20. After filtering a total of 43.98×10^6 , 40.52×10^6 and 44.28×10^6 reads of amastigotes, trypomastigotes and epimastigotes were obtained, respectively. The reads were aligned to the reference genome of *T. cruzi* Dm28c (24, 30-Mar-2015) using Bowtie (allowing two/three base pair mismatches for 36/72bp reads respectively).

To estimate transcript levels we used ERANGE software that considers the unique regions of the genes to re-normalize the assignment of multimatching reads. The CDS plus an extension of 200bp at both sides (to the normalization process) were processed.

Differential expression analyses were performed using the R/Bioconductor package DESeq2.

Normalized counts were obtained from DESeq2 with the function *count (dds, normalized=T)*. Differential expressed genes (DEGs) were defined as genes with at least a two-fold change in expression levels and FDR < 0,05.

Gene Ontology analyses were performed using Tritypdb tools with Fisher exact test filtering for false discovery rate (FDR) lower than 0,05.

Visual inspection of the alignment was performed using The Integrative Genomics Viewer (IGV)(Robinson, Thorvaldsdottir et al. 2011).

In order to find possible new transcripts, libraries were pooled and aligned to reference genome using Bowtie (seed length 15, maximum mismatches in seed 1). The de novo RNA-Seq transcript assembly was performed using Cufflinks including the bias correction, the 'rescue method' for multi-reads and the 3' overhang-tolerance set as 200 (Trapnell, Williams et al. 2010). TransDecoder was used to identify candidate coding regions within transcript sequences and open reading features (ORFs) smaller than 300pb were discarded. Functional annotation of the translated ORF was done by HMM search (HMMER 3.1 (Mistry, Finn et al. 2013)) against pfam database ((Finn, Bateman et al. 2014) and by Blastp search against nr NCBI (all non-redundant GenBank CDS translations) filtering for e-value lower than 1×10^{-5} . Further filter including minimum alignment identity of 60%, minimum query alignment length 60% and, minimum subject alignment length 60% were incorporated to select complete genes.

3'UTR sequences of Dm28c genes were obtained from TriTrypDB.org extracting 400pb after the transcriptional stop codon.

Alignments were performed with Clustalw2 (Larkin, Blackshields et al. 2007) and phylogenetic analysis with PhyML3.1 (Guindon, Dufayard et al. 2010). Modelgenerator (Keane, Creevey et al. 2006) was used to select adequate substitution models. JTT was used for protein sequences and HKY85 was selected for nucleotide sequences. Visualization of phylogenies was performed with Figtree 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

For GPI identification we used PredGPI predictor (Pierleoni, Martelli et al. 2008). A total of 782 proteins were identified to present at least one potential GPI-modification site.

Acknowledgements

638 All sequences were performed at the Molecular Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo.

639 The authors thank Natalia Rego and Horacio Botti for very helpful discussion and suggestions,
640 Hugo Naya for sharing the bioinformatic facilities of UBI Institut Pasteur Montevideo

641 **Funding**

642 This work was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay) grant
643 DCI-ALA/2011/023-502 “Contrato de apoyo a las políticas de innovación y cohesión territorial”
644 and FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Found) COF 03/11.

645 **Authors' contributions**

646 MLC and GG performed library preparation and sequencing. MR performed several Perl and
647 Python scripts. LB and GG were in charge of bioinformatic analysis. MLC was in charge of
648 parasite cultures, experimental infection, RNA isolation and purification. CR and FAV conceived
649 the work. LB, MLC, FAV and CR wrote the manuscript. All authors read and approved the final
650 version of the manuscript.

651 **Competing interests**

652 Authors declare that they have no competing interests.

653

654

655 **Figure Legends**

656 **Figure 1 Differential expression of the surface components.** Heatmap of
 657 glycoproteins genes significantly regulated during the life-cycle of *Trypanosoma cruzi*.
 658 The z-score is plotted, red bars represent up regulation and blue bars represent down
 659 regulation.

660 **Figure 2 Stage specific TS examination.** Representation of predicted molecular
 661 weights of trans-sialidases specific from amastigotes (aTS, green), epimastigotes (eTS,
 662 blue) and trypomastigotes (tTS, orange). T test was performed, ** represent p-
 663 value<0.01.

664 **Figure 3 GP63 3'UTR phylogeny.** Neighborjoining tree of the 3'UTR of GP63 genes;
 665 numbers correspond to gene ID in Dm28c annotation. Differentially up-regulated in A
 666 (green), differentially up-regulated in T (orange), very low or null levels of expression
 667 (blue).

668 **Figure 4 Surface gene composition in different *T. cruzi* stages.** A) Expression of
 669 each gene in normalized read counts is shown for the different group of membrane
 670 component. At the X axis each gene is plotted at the same order, for the three stages.
 671 B) Sum of total normalized read counts per gene Kb of each family group in the three
 672 stages. Different cycle stages are represented: amastigote (green), epimastigote (blue)
 673 and trypomastigote (orange).

674 **Figure 5 Differential expression in metabolic pathways.** Normalized read counts for
 675 each stage is shown for A) Oxidative phosphorylation; B) Antioxidant defense; and C)
 676 Pentose phosphate pathway. Different cycle stages are represented: amastigote
 677 (green), epimastigote (blue) and trypomastigote (orange).

Figure 6 Expression of steroid biosynthesis related genes. Total normalized count of reads is shown for Steroid metabolism genes for the three stages: amastigote (green), epimastigote (blue) and trypomastigote (orange).

Figure 7 Glucose metabolism. A) Schematic diagram of glucose catabolism. Each reaction is assigned with a number (1: hexokinase, 2: phosphoglucomutase, 3: glucose-6-phosphate isomerase, 4: phosphofructokinase, 5: fructose-1,6-biphosphatase, 6: aldolase, 7: triosephosphate isomerase, 8: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 9: phosphoglycerate kinase, 10: enolase and 10: pyruvate kinase 2). B) Expression of glucose metabolism genes of each reaction is shown as normalized count per gene size in kilobases. The three cycle stages are represented: amastigote (green), epimastigote (blue) and trypomastigote (orange).

Figure 8 Expression of genes related to amino acid transport and metabolism. Total normalized Read counts of some genes coding amino acids transporters and nitrogen and amino acid related metabolism. The three cycle stages are represented: amastigote (green), epimastigote (blue) and trypomastigote (orange)

Figure 9 Membrane down-regulated genes in Epimastigotes. Pie chart representation of the percentage of down-regulated genes in epimastigote of each membrane protein category analyzed.

Figure 10 Expression levels overview of *Trypanosoma cruzi*. A) Diagram of the *Trypanosoma cruzi* stages and the major findings of transcriptoma analysis. B) Gene ontology (GO) enrichment analysis, showing GO terms exhibiting statistical significant differences (Fisher Exact Test, filtering p-values for multiple testing using False Discovery Rate) for the most expressed genes specific to amastigote (green), epimastigote (blue) and trypomastigote (orange).

703

704

705

706

707

708

709 **Additional files**

710 Additional file 1
 711 Excel
 712 Highly expressed genes and GO analyses
 713 Comparison of 500 highest expressed genes among stages and Gene Ontology analysis

714 Additional file 2
 715 Excel
 716 Differentially expressed genes
 717 Result of differentially expression analysis. Gene ontology of stage specific DEGs

718 Additional file 3
 719 pdf
 720 GP63 phylogeny
 721 Neighborjoining tree of the protein sequences of GP63 genes; numbers correspond to
 722 gene ID. Differentially up-regulated in A (green), differentially up-regulated in T
 723 (orange)

724 Additional file 4
 725 Excel
 726 Oxidative metabolism
 727 Normalized read counts of Krebs cycle and respiratory chain genes

728 Additional file 5
 729 Excel
 730 Antioxidant genes
 731 Normalized read counts of antioxidant genes

732 Additional file 6
 733 Excel
 734 Lipid metabolism
 735 Normalized read counts of genes related to different lipid related metabolic processes: fatty
 736 acid, steroid and phospholipid

737 Additional file 7
 738 Excel
 739 Carbohydrate metabolism
 740 Normalized read counts of glycolytic and pentose phosphate pathway genes

741 Additional file 8
 742 Excel
 743 Protein metabolism
 744 Normalized read counts of genes coding general protein metabolic pathways including protein
 745 degradation, protein synthesis, amino acid transport and metabolism

746 Additional file 9
 747 Excel
 748 New genes prediction
 749 Characterization of putative new transcripts predicted for Dm28c. Statistical description of the
 750 validation by HMM and Blast searches

751 Additional file 10
752 pdf
753 Gene expression patterns
754 Comparison to known and particular protein expression profiles

755

756

757

758

759

760

761

762 **References**

- 763 Acosta-Serrano, A., I. C. Almeida, et al. (2001). "The mucin-like glycoprotein super-family of
764 Trypanosoma cruzi: structure and biological roles." Mol Biochem Parasitol **114**(2): 143-
765 150.
- 766 Acosta-Serrano, A., R. N. Cole, et al. (2000). "Killing of Trypanosoma brucei by concanavalin A:
767 structural basis of resistance in glycosylation mutants." J Mol Biol **304**(4): 633-644.
- 768 Alonso, G. D., C. A. Pereira, et al. (2001). "Arginine kinase of the flagellate protozoa
769 Trypanosoma cruzi. Regulation of its expression and catalytic activity." FEBS Lett
770 **498**(1): 22-25.
- 771 Arner, E., E. Kindlund, et al. (2007). "Database of Trypanosoma cruzi repeated genes: 20,000
772 additional gene variants." BMC Genomics **8**: 391.
- 773 Atwood, J. A., 3rd, D. B. Weatherly, et al. (2005). "The Trypanosoma cruzi proteome." Science
774 **309**(5733): 473-476.
- 775 Atwood, J. A., T. Minning, et al. (2006). "Glycoproteomics of Trypanosoma cruzi
776 trypomastigotes using subcellular fractionation, lectin affinity, and stable isotope
777 labeling." Journal of Proteome Research **5**(12): 3376-3384.
- 778 Bartholomeu, D. C., G. C. Cerqueira, et al. (2009). "Genomic organization and expression
779 profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen
780 Trypanosoma cruzi." Nucleic Acids Research **37**(10): 3407-3417.
- 781 Brandao, A. and T. Jiang (2009). "The composition of untranslated regions in Trypanosoma
782 cruzi genes." Parasitol Int **58**(3): 215-219.
- 783 Brener, Z. (1973). "Biology of Trypanosoma cruzi." Annu Rev Microbiol **27**: 347-382.
- 784 Bringaud, F., L. Riviere, et al. (2006). "Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to
785 available carbon sources." Mol Biochem Parasitol **149**(1): 1-9.
- 786 Buscaglia, C. A., V. A. Campo, et al. (2006). "Trypanosoma cruzi surface mucins: host-
787 dependent coat diversity." Nat Rev Microbiol **4**(3): 229-236.
- 788 Buscaglia, C. A., V. A. Campo, et al. (2006). "Trypanosoma cruzi surface mucins: host-
789 dependent coat diversity." Nat Rev Micro **4**(3): 229-236.
- 790 Carranza, J. C., A. J. Kowaltowski, et al. (2009). "Mitochondrial bioenergetics and redox state
791 are unaltered in Trypanosoma cruzi isolates with compromised mitochondrial complex
792 I subunit genes." J Bioenerg Biomembr **41**(3): 299-308.
- 793 Cazzulo, J. J. (1984). "Protein and amino acid catabolism in Trypanosoma cruzi." Comp Biochem
794 Physiol B **79**(3): 309-320.
- 795 Cazzulo, J. J. (1992). "Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids." FASEB J **6**(13):
796 3153-3161.
- 797 Cazzulo, J. J. (1992). "Energy metabolism in Trypanosoma cruzi." Subcell Biochem **18**: 235-257.
- 798 Clark, D., M. Albrecht, et al. (1994). "Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase
799 activity in Trypanosoma cruzi epimastigotes and trypomastigotes." Mol Biochem
800 Parasitol **66**(1): 143-145.
- 801 Coughlin, B. C., S. M. Teixeira, et al. (2000). "Amastin mRNA abundance in Trypanosoma cruzi is
802 controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an
803 untranslated region-binding protein." J Biol Chem **275**(16): 12051-12060.
- 804 Cuevas, I. C., J. J. Cazzulo, et al. (2003). "gp63 Homologues in Trypanosoma cruzi: Surface
805 Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection."
806 Infection and Immunity **71**(10): 5739-5749.
- 807 Chagas (1909). "Nova tripanozomiaz humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo
808 do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do
809 homem." Mem. Inst. Oswaldo Cruz **1**(2): 59.

- Chaves, L. B., M. R. Briones, et al. (1993). "Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is expressed at the stationary phase and is different from the enzyme expressed in trypomastigotes." Mol Biochem Parasitol **61**(1): 97-106.
- Chiribao, M. L., M. G. Libisch, et al. (2012). "Cloning, localization and differential expression of the *Trypanosoma cruzi* TcOGNT-2 glycosyl transferase." Gene **498**(2): 147-154.
- da Silva, R. A., D. C. Bartholomeu, et al. (2006). "Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*." International Journal for Parasitology **36**(1): 87-96.
- Daniels, J. P., K. Gull, et al. (2010). "Cell biology of the trypanosome genome." Microbiol Mol Biol Rev **74**(4): 552-569.
- Daran-Lapujade, P., S. Rossell, et al. (2007). "The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15753-15758.
- de Lederkremer, R. M. and R. Agusti (2009). "Glycobiology of *Trypanosoma cruzi*." Adv Carbohydr Chem Biochem **62**: 311-366.
- De Pablos, L. M. and A. Osuna (2012). "Conserved regions as markers of different patterns of expression and distribution of the mucin-associated surface proteins of *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **80**(1): 169-174.
- De Pablos, L. M. and A. Osuna (2012). "Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity." Infect Immun **80**(7): 2258-2264.
- Denicola-Seoane, A., H. Rubbo, et al. (1992). "Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes." Mol Biochem Parasitol **54**(1): 43-50.
- Di Noia, J. M., I. D'Orso, et al. (2000). "AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency." J Biol Chem **275**(14): 10218-10227.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, et al. (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science (New York, N.Y.) **309**(5733): 409-415.
- Engel, J. C., B. M. Franke de Cazzulo, et al. (1987). "Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes." Mol Biochem Parasitol **26**(1-2): 1-10.
- Ferrero-García, M. A., S. E. Trombetta, et al. (1993). "The action of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on glycolipids and glycoproteins." European journal of biochemistry / FEBS **213**(2): 765-771.
- Finn, R. D., A. Bateman, et al. (2014). "Pfam: the protein families database." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D222-230.
- Florin-Christensen, M., J. Florin-Christensen, et al. (1997). "Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids." Mol Biochem Parasitol **88**(1-2): 25-33.
- Franzén, O., S. Ochaya, et al. (2011). "Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener." PLoS neglected tropical diseases **5**(3): e984.
- Franzén, O., C. Talavera-López, et al. (2012). "Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*." BMC genomics **13**: 531.
- Frasch, A. C. (2000). "Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*." Parasitology Today (Personal Ed.) **16**(7): 282-286.
- Freitas, L. M., S. L. d. Santos, 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**(10): e25914.

- Grandgenett, P. M., B. C. Coughlin, et al. (2000). "Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*." Molecular and Biochemical Parasitology **110**(2): 409-415.
- Grisard, E. C., S. M. R. Teixeira, et al. (2014). "Trypanosoma cruzi Clone Dm28c Draft Genome Sequence." Genome Announcements **2**(1).
- Guindon, S., J.-F. Dufayard, et al. (2010). "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0." Systematic Biology **59**(3): 307-321.
- Han, J. M., S. J. Jeong, et al. (2012). "Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway." Cell **149**(2): 410-424.
- Homsy, J. J., B. Granger, et al. (1989). "Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*." J Protozool **36**(2): 150-153.
- Kawashita, S. Y., C. V. da Silva, et al. (2009). "Homology, paralogy and function of DGF-1, a highly dispersed *Trypanosoma cruzi* specific gene family and its implications for information entropy of its encoded proteins." Molecular and Biochemical Parasitology **165**(1): 19-31.
- Keane, T. M., C. J. Creevey, et al. (2006). "Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified." BMC Evolutionary Biology **6**: 29.
- Ko, Y. G., E. Y. Kim, et al. (2001). "Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutaminyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1." J Biol Chem **276**(8): 6030-6036.
- Kramer, S. (2012). "Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids." Mol Biochem Parasitol **181**(2): 61-72.
- Langmead, B., C. Trapnell, et al. (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome." Genome Biol **10**(3): R25.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-2948.
- Liendo, A., G. Visbal, et al. (1999). "Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes." Mol Biochem Parasitol **104**(1): 81-91.
- Logan, F. J., M. C. Taylor, et al. (2007). "The terminal step in vitamin C biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* is mediated by a FMN-dependent galactonolactone oxidase." Biochem J **407**(3): 419-426.
- Magdesian, M. H., R. Giordano, et al. (2001). "Infection by *Trypanosoma cruzi* IDENTIFICATION OF A PARASITE LIGAND AND ITS HOST CELL RECEPTOR." Journal of Biological Chemistry **276**(22): 19382-19389.
- Mistry, J., R. D. Finn, et al. (2013). "Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions." Nucleic Acids Res **41**(12): e121.
- Mortazavi, A., B. A. Williams, et al. (2008). "Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq." Nat Methods **5**(7): 621-628.
- Munoz, C., J. San Francisco, et al. (2015). "Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites." Biomed Res Int **2015**: 141526.
- Norris, K. A., G. Harth, et al. (1989). "Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies." Infect Immun **57**(8): 2372-2377.
- Nozaki, T. and G. A. Cross (1995). "Effects of 3' untranslated and intergenic regions on gene expression in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **75**(1): 55-67.
- Parodi-Talice, A., R. Duran, et al. (2004). "Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*." Int J Parasitol **34**(8): 881-886.
- Pierleoni, A., P. L. Martelli, et al. (2008). "PredGPI: a GPI-anchor predictor." BMC Bioinformatics **9**: 392.

- Robello, C., P. Navarro, et al. (1997). "A pteridine reductase gene ptr1 contiguous to a P-glycoprotein confers resistance to antifolates in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **90**(2): 525-535.
- Robinson, J. T., H. Thorvaldsdottir, et al. (2011). "Integrative genomics viewer." Nat Biotechnol **29**(1): 24-26.
- Rosenberg, I., R. P. Prioli, et al. (1991). "Stage-specific phospholipase C-mediated release of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase." Mol Biochem Parasitol **46**(2): 303-305.
- Sanchez-Moreno, M., M. C. Fernandez-Becerra, et al. (1995). "Metabolic studies by ¹H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by 'in vitro' culture." FEMS Microbiol Lett **133**(1-2): 119-125.
- Schenkman, S. and D. Eichinger (1993). "*Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion." Parasitol Today **9**(6): 218-222.
- Schenkman, S., M. S. Jiang, et al. (1991). "A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells." Cell **65**(7): 1117-1125.
- Silber, A. M., W. Colli, et al. (2005). "Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease." Curr Drug Targets Infect Disord **5**(1): 53-64.
- Tonelli, R. R., R. J. Giordano, et al. (2010). "Role of the gp85/Trans-Sialidases in *Trypanosoma cruzi* Tissue Tropism: Preferential Binding of a Conserved Peptide Motif to the Vasculature In Vivo." PLoS Neglected Tropical Diseases **4**(11).
- Tonelli, R. R., A. M. Silber, et al. (2004). "L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*." Cell Microbiol **6**(8): 733-741.
- Trapnell, C., B. A. Williams, et al. (2010). "Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation." Nature Biotechnology **28**(5): 511-515.
- Vanhamme, L. and E. Pays (1995). "Control of gene expression in trypanosomes." Microbiol Rev **59**(2): 223-240.
- Vickerman, K., Preston, T.M (1976). "Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates." Biology of the kinetoplastida **1**.
- Weston, D., A. C. La Flamme, et al. (1999). "Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic, and the coding regions." Mol Biochem Parasitol **102**(1): 53-66.
- Yao, C., J. E. Donelson, et al. (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function." Mol Biochem Parasitol **132**(1): 1-16.
- Ziccardi, M. and A. Brandao (2011). "Transcription of long hypothetical orfs in *Trypanosoma cruzi*: the epimastigote stage uses trans-splicing sites that generate short 5' UTRs." Exp Parasitol **129**(2): 203-206.

K. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa, H., et al., *Human cytomegalovirus gene UL76 induces IL-8 expression through activation of the DNA damage response*. PLoS Pathog, 2013. **9**(9): p. e1003609.
2. de Souza, W., T.M. de Carvalho, and E.S. Barrias, *Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction*. Int J Cell Biol, 2010. **2010**.
3. Clayton, C.E., *Gene expression in Kinetoplastids*. Curr Opin Microbiol, 2016. **32**: p. 46-51.
4. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
5. Pineyro, M.D., et al., *Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite Trypanosoma cruzi*. J Struct Biol, 2005. **150**(1): p. 11-22.
6. Chagas, C., *Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1909. **1**(2): p. 159-218.
7. Medone, P., et al., *Life History Traits and Demographic Parameters of Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) Fed on Human Blood*. J Med Entomol, 2015. **52**(6): p. 1282-90.
8. Rassi, A. and J.M. de Rezende, *American trypanosomiasis (Chagas disease)*. Infectious disease clinics of North America, 2012. **26**(2): p. 275-291.
9. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J. Marcondes de Rezende, *American trypanosomiasis (Chagas disease)*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(2): p. 275-91.
10. Salvatella, R., *Chagas en Uruguay, 1937-2016: Información básica para su prevención, control y atención*. Archivos de Pediatría del Uruguay, 2016. **87**(1): p. 49-52.
11. Gascon, J., C. Bern, and M.-J. Pinazo, *Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries*. Acta tropica, 2010. **115**(1): p. 22-27.
12. Cordeiro-Barbosa, F., F. Oréfice, and D.V. Vasconcelos-Santos, *American Trypanosomiasis: Chagas Disease*, in *Intraocular Inflammation*. 2016, Springer. p. 1413-1417.
13. Rassi, A. and J.A. Marin-Neto, *Chagas disease*. The Lancet, 2010. **375**(9723): p. 1388-1402.
14. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and W.C. Little, *Chagas' heart disease*. Clin Cardiol, 2000. **23**(12): p. 883-9.
15. Bonney, K.M. and D.M. Engman, *Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead*. The American journal of pathology, 2015. **185**(6): p. 1537-1547.
16. Marin-Neto, J.A., et al., *Pathogenesis of chronic Chagas heart disease*. Circulation, 2007. **115**(9): p. 1109-1123.

17. Morillo, C.A., et al., *Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(14): p. 1295-1306.
18. Junqueira, A.C., W. Degraeve, and A. Brandao, *Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi populations*. Trends Parasitol, 2005. **21**(6): p. 270-2.
19. Zingales, B., et al., *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(7): p. 1051-4.
20. Brenière, S.F., E. Waleckx, and C. Barnabé, *Over Six Thousand Trypanosoma cruzi Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(8): p. e0004792.
21. Fernandes, A.B. and R.A. Mortara, *Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by Trypanosoma cruzi amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages*. Microbes and infection, 2004. **6**(5): p. 460-467.
22. Mortara, R.A., *Trypanosoma cruzi: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells*. Experimental parasitology, 1991. **73**(1): p. 1-14.
23. Bringaud, F., L. Rivière, and V. Coustou, *Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources*. Molecular and biochemical parasitology, 2006. **149**(1): p. 1-9.
24. Kollien, A.H. and G.A. Schaub, *The development of Trypanosoma cruzi in triatominae*. Parasitol Today, 2000. **16**(9): p. 381-7.
25. Parodi-Talice, A., et al., *Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing Trypanosoma cruzi metacyclogenesis*. J Mass Spectrom, 2007. **42**(11): p. 1422-32.
26. Nogueira, N.P., et al., *Proliferation and differentiation of Trypanosoma cruzi inside its vector have a new trigger: redox status*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0116712.
27. Cazzulo, J.J., *Energy metabolism in Trypanosoma cruzi*, in *Intracellular Parasites*. 1992, Springer. p. 235-257.
28. Tyler, K., C. Olson, and D. Engman, *The life cycle of Trypanosoma cruzi*, in *American Trypanosomiasis*. 2003, Springer. p. 1-11.
29. Vanhamme, L. and E. Pays, *Control of gene expression in trypanosomes*. Microbiol Rev, 1995. **59**(2): p. 223-40.
30. Ouellette, M. and B. Papadopoulou, *Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes*. J Biol, 2009. **8**(11): p. 100.
31. Jensen, B.C., et al., *Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of Trypanosoma brucei*. BMC genomics, 2009. **10**(1): p. 1.
32. Li, Y., et al., *Transcriptome Remodeling in Trypanosoma cruzi and Human Cells during Intracellular Infection*. PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005511.

33. Minning, T.A., et al., *The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of Trypanosoma cruzi*. BMC genomics, 2009. **10**(1): p. 1.
34. Akopyants, N.S., et al., *Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **136**(1): p. 71-86.
35. Kramer, S. and M. Carrington, *Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids*. Trends in parasitology, 2011. **27**(1): p. 23-30.
36. Jensen, B.C., et al., *Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of Trypanosoma brucei*. BMC genomics, 2014. **15**(1): p. 1.
37. Smircich, P., et al., *Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in Trypanosoma cruzi*. BMC genomics, 2015. **16**(1): p. 1.
38. Siegel, T.N., et al., *Gene expression in Trypanosoma brucei: lessons from high-throughput RNA sequencing*. Trends in parasitology, 2011. **27**(10): p. 434-441.
39. Ekanayake, D. and R. Sabatini, *Epigenetic regulation of polymerase II transcription initiation in Trypanosoma cruzi: modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by O-linked thymine DNA glucosylation*. Eukaryot Cell, 2011. **10**(11): p. 1465-72.
40. Burleigh, B.A. and A.M. Woolsey, *Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion*. Cellular Microbiology, 2002. **4**(11): p. 701-711.
41. Tarleton, R.L., *Immune system recognition of Trypanosoma cruzi*. Current opinion in immunology, 2007. **19**(4): p. 430-434.
42. Takeda, K. and S. Akira. *TLR signaling pathways*. in *Seminars in immunology*. 2004. Elsevier.
43. Koga, R., et al., *TLR-dependent induction of IFN- β mediates host defense against Trypanosoma cruzi*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(10): p. 7059-7066.
44. 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.
45. Medeiros, M.M., et al., *Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from Trypanosoma cruzi*. Journal of leukocyte biology, 2007. **82**(3): p. 488-496.
46. Fernandez-Gomez, R., et al., *Trypanosoma cruzi: Tc52 released protein-induced increased expression of nitric oxide synthase and nitric oxide production by macrophages*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(7): p. 3471-3479.
47. Ouaisi, A., et al., *The Trypanosoma cruzi Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(12): p. 6366-6374.

48. Bafica, A., et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(6): p. 3515-3519.
49. 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*. The Journal of Immunology, 2004. **172**(3): p. 1711-1718.
50. 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.
51. Gazzinelli, R.T., et al., *The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2501-6.
52. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nature reviews immunology, 2008. **8**(12): p. 958-969.
53. Alvarez, M.N., et al., *Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to Trypanosoma cruzi*. Arch Biochem Biophys, 2004. **432**(2): p. 222-32.
54. Piacenza, L., et al., *Peroxiredoxins play a major role in protecting Trypanosoma cruzi against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite*. Biochem J, 2008. **410**(2): p. 359-68.
55. Pineyro, M.D., et al., *Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?* Gene, 2008. **408**(1-2): p. 45-50.
56. Lieke, T., et al., *NK cells contribute to the control of Trypanosoma cruzi infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms*. Infection and immunity, 2004. **72**(12): p. 6817-6825.
57. Morrot, A. and F. Zavala, *Effector and memory CD8+ T cells as seen in immunity to malaria*. Immunological reviews, 2004. **201**(1): p. 291-303.
58. Parker, S., C. Roberts, and J. Alexander, *CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to Toxoplasma gondii in mice*. Clinical & Experimental Immunology, 1991. **84**(2): p. 207-212.
59. Belkaid, Y., et al., *CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(8): p. 3992-4000.
60. Diez, H., et al., *Evaluation of IFN- γ production by CD8+ T lymphocytes in response to the K1 peptide from KMP-11 protein in patients infected with Trypanosoma cruzi*. Parasite immunology, 2006. **28**(3): p. 101-105.
61. Martin, D., et al., *CD8+ T-cell responses to Trypanosoma cruzi are highly focused on strain-variant trans*. 2006.
62. Yoshida, N., *Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 2006. **78**(1): p. 87-111.

63. El-Sayed, N.M., et al., *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. Science, 2005. **309**(5733): p. 409-15.
64. Cabral, M.M., et al., *Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol, 2010. **124**(3): p. 319-24.
65. De Pablos, L.M. and A. Osuna, *Multigene families in Trypanosoma cruzi and their role in infectivity*. Infection and immunity, 2012. **80**(7): p. 2258-2264.
66. Cross, G.A. and G.B. Takle, *The surface trans-sialidase family of Trypanosoma cruzi*. Annual Reviews in Microbiology, 1993. **47**(1): p. 385-411.
67. Schenkman, S., et al., *Structural and functional properties of Trypanosoma trans-sialidase*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 499-523.
68. Schenkman, S. and D. Eichinger, *Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion*. Parasitology Today, 1993. **9**(6): p. 218-222.
69. Buscaglia, C.A., et al., *Tandem amino acid repeats from Trypanosoma cruzi shed antigens increase the half-life of proteins in blood*. Blood, 1999. **93**(6): p. 2025-2032.
70. Buscaglia, C.A., et al., *The repetitive domain of Trypanosoma cruzi trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain*. Journal of Infectious Diseases, 1998. **177**(2): p. 431-436.
71. Cremona, M.L., et al., *A single tyrosine differentiates active and inactive Trypanosoma cruzi trans-sialidases*. Gene, 1995. **160**(1): p. 123-128.
72. Frevert, U., S. Schenkman, and V. Nussenzweig, *Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi*. Infection and immunity, 1992. **60**(6): p. 2349-2360.
73. El-Sayed, N.M., et al., *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. Science (New York, N.Y.), 2005. **309**(5733): p. 409-415.
74. Acosta-Serrano, A., et al., *The mucin-like glycoprotein super-family of Trypanosoma cruzi: structure and biological roles*. Mol Biochem Parasitol, 2001. **114**(2): p. 143-50.
75. Freitas-Junior, L.H., M.R. Briones, and S. Schenkman, *Two distinct groups of mucin-like genes are differentially expressed in the developmental stages of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 1998. **93**(1): p. 101-14.
76. Buscaglia, C.A., et al., *Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity*. Nature Reviews Microbiology, 2006. **4**(3): p. 229-236.
77. Bartholomeu, D.C., et al., *Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(10): p. 3407-17.
78. De Pablos, L.M., et al., *Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 2011. **79**(10): p. 3993-4001.

79. dos Santos, S.L., et al., *The MASP family of Trypanosoma cruzi: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(8): p. e1779.
80. Songthamwat, D., et al., *Structure and expression of three gp82 gene subfamilies of Trypanosoma cruzi*. Parasitology international, 2007. **56**(4): p. 273-280.
81. Neira, I., et al., *Involvement of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 557-561.
82. Staquicini, D.I., et al., *Role of GP82 in the selective binding to gastric mucin during oral infection with Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(3): p. e613.
83. Franco, F.R., et al., *Characterization of a cDNA clone encoding the carboxy-terminal domain of a 90-kilodalton surface antigen of Trypanosoma cruzi metacyclic trypomastigotes*. Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4196-201.
84. Cortez, M., et al., *Trypanosoma cruzi surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice*. Microbes and infection, 2006. **8**(1): p. 36-44.
85. Malaga, S. and N. Yoshida, *Targeted reduction in expression of Trypanosoma cruzi surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity*. Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 353-9.
86. Nickel, W. and M. Seedorf, *Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells*. Annual review of cell and developmental biology, 2008. **24**: p. 287-308.
87. Bayer-Santos, E., et al., *Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins*. Journal of proteome research, 2013. **12**(2): p. 883-897.
88. R, Q., et al., *Insight into the Exoproteome of the Tissue-Derived Trypomastigote form of Trypanosoma cruzi*. Frontiers in Chemistry, 2016. **4**.
89. György, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cellular and molecular life sciences, 2011. **68**(16): p. 2667-2688.
90. Mathivanan, S., et al., *ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids*. Nucleic acids research, 2012. **40**(D1): p. D1241-D1244.
91. Muralidharan-Chari, V., et al., *Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression*. Journal of cell science, 2010. **123**(10): p. 1603-1611.
92. Silverman, J.M., et al., *An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages*. J Cell Sci, 2010. **123**(6): p. 842-852.
93. Geiger, A., et al., *Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma*. BMC microbiology, 2010. **10**(1): p. 1.
94. Silverman, J.M., et al., *Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells*. The Journal of Immunology, 2010. **185**(9): p. 5011-5022.

95. Silverman, J.M. and N.E. Reiner, *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2012. **1**: p. 26.
96. Szempruch, A.J., et al., *Extracellular vesicles from Trypanosoma brucei mediate virulence factor transfer and cause host anemia*. *Cell*, 2016. **164**(1): p. 246-257.
97. Trocoli Torrecilhas, A.C., et al., *Trypanosoma cruzi: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response*. *Microbes Infect*, 2009. **11**(1): p. 29-39.
98. Goncalves, M.F., et al., *Trypanosoma cruzi: shedding of surface antigens as membrane vesicles*. *Exp Parasitol*, 1991. **72**(1): p. 43-53.
99. Ouaisi, A., et al., *Cloning and sequencing of a 24-kDa Trypanosoma cruzi specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody*. *Biology of the Cell*, 1992. **75**: p. 11-17.
100. Affranchino, J., et al., *Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease*. *Molecular and biochemical parasitology*, 1989. **34**(3): p. 221-228.
101. Yokoyama-Yasunaka, J.K., et al., *Trypanosoma cruzi: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms*. *Acta tropica*, 1994. **57**(4): p. 307-315.
102. Alves, M.J.M. and W. Colli, *Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of Trypanosoma cruzi with host structures*, in *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion*. 2008, Springer. p. 58-69.
103. Chuenkova, M.V., et al., *Trypanosoma cruzi trans-sialidase: a potent and specific survival factor for human Schwann cells by means of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(17): p. 9936-41.
104. Chuenkova, M.V. and M.A. Pereira, *A trypanosomal protein synergizes with the cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis of neuronal cells*. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(4): p. 1487-98.
105. Woronowicz, A., et al., *Trypanosome trans-sialidase mediates neuroprotection against oxidative stress, serum/glucose deprivation, and hypoxia-induced neurite retraction in Trk-expressing PC12 cells*. *Glycobiology*, 2007. **17**(7): p. 725-734.
106. Todeschini, A.R., et al., *Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling*. *The Journal of Immunology*, 2002. **168**(10): p. 5192-5198.
107. Nardy, A.F., et al., *Role of Trypanosoma cruzi Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance*. *Front Microbiol*, 2016. **7**: p. 348.
108. Gea, S., et al., *Cruzipain a major Trypanosoma cruzi cystein protease in host-parasite interplay*. *Inmunología España*, 2006. **25**: p. 225-238.
109. Bontempi, E. and J.J. Cazzulo, *Digestion of human immunoglobulin G by the major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi*. *FEMS microbiology letters*, 1990. **70**(3): p. 337-341.

110. Berasain, P., et al., *Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi*. Molecular and biochemical parasitology, 2003. **130**(1): p. 23-29.
111. Scharfstein, J., *Activation of Bradykinin-Receptors by Trypanosoma cruzi*. Molecular Mechanisms of Pathogenesis in Chagas' Disease, 2003: p. 111.
112. Souto-Padron, T., et al., *Cysteine proteinase in Trypanosoma cruzi: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction*. Journal of Cell Science, 1990. **96**(3): p. 485-490.
113. Monteiro, A.C., et al., *Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by Trypanosoma cruzi*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(9): p. 6325-6335.
114. Aliberti, J., et al., *Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(11): p. 5349-5353.
115. Monteiro, A.C., et al., *Bradykinin B 2 receptors of dendritic cells, acting as sensors of kinins proteolytically released by Trypanosoma cruzi, are critical for the development of protective type-1 responses*. PLoS Pathog, 2007. **3**(11): p. e185.
116. Stempin, C.C., et al., *Arginase induction promotes Trypanosoma cruzi intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways*. European journal of immunology, 2004. **34**(1): p. 200-209.
117. Giordanengo, L., et al., *Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi antigen, conditions the host immune response in favor of parasite*. European journal of immunology, 2002. **32**(4): p. 1003-1011.
118. Stempin, C.C., et al., *Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of Trypanosoma cruzi in macrophages*. Acta tropica, 2008. **106**(2): p. 119-127.
119. Guinazu, N., et al., *Immunisation with a major Trypanosoma cruzi antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression*. Int J Parasitol, 2007. **37**(11): p. 1243-54.
120. Guinazu, N., et al., *Immune response to a major Trypanosoma cruzi antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice*. Microbes Infect, 2004. **6**(14): p. 1250-8.
121. Wilkinson, S.R., et al., *Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 8220-5.
122. Pineyro, M.D., et al., *Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite*. Arch Biochem Biophys, 2011. **507**(2): p. 287-95.
123. Müller, S., et al., *Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites*. Trends in parasitology, 2003. **19**(7): p. 320-328.
124. Lopez, J.A., et al., *Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in Trypanosoma cruzi*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(5): p. 767-72.

125. Krauth-Siegel, R.L. and M.A. Comini, *Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2008. **1780**(11): p. 1236-1248.
126. Piñeyro, M.D., et al., *Tryparedoxin peroxidases from Trypanosoma cruzi: high efficiency in the catalytic elimination of hydrogen peroxide and peroxynitrite*. Archives of biochemistry and biophysics, 2011. **507**(2): p. 287-295.
127. Hofmann, B., H.J. Hecht, and L. Flohe, *Peroxiredoxins*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 347-64.
128. Alvarez, M.N., et al., *Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized trypanosoma cruzi consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(8): p. 6627-6640.
129. Aguiar, P.H., et al., *Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in Trypanosoma cruzi cell viability*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(6): p. e2279.
130. Ishii, T., E. Warabi, and T. Yanagawa, *Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity*. J Clin Biochem Nutr, 2012. **50**(2): p. 91-105.
131. Irokawa, H., et al., *Redox-dependent Regulation of Gluconeogenesis by a Novel Mechanism Mediated by a Peroxidatic Cysteine of Peroxiredoxin*. Scientific Reports, 2016. **6**.
132. Donnelly, S., et al., *Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages*. The FASEB Journal, 2008. **22**(11): p. 4022-4032.
133. Riddell, J.R., et al., *Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4*. The journal of immunology, 2010. **184**(2): p. 1022-1030.
134. Marshall, E.S., et al., *Toxoplasma gondii peroxiredoxin promotes altered macrophage function, caspase-1-dependent IL-1 β secretion enhances parasite replication*. Veterinary research, 2011. **42**(1): p. 1.
135. Riddell, J.R., et al., *Peroxiredoxin 1 stimulates endothelial cell expression of VEGF via TLR4 dependent activation of HIF-1 α* . PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50394.
136. Menezes Cabral, S., et al., *A Leishmania infantum cytosolic tryparedoxin activates B cells to secrete interleukin-10 and specific immunoglobulin*. Immunology, 2008. **123**(4): p. 555-565.
137. Genovesio, A., et al., *Visual genome-wide RNAi screening to identify human host factors required for Trypanosoma cruzi infection*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19733.
138. Caradonna, K.L., et al., *Host metabolism regulates intracellular growth of Trypanosoma cruzi*. Cell host & microbe, 2013. **13**(1): p. 108-117.
139. Sugden, M., K. Bulmer, and M. Holness, *Fuel-sensing mechanisms integrating lipid and carbohydrate utilization*. Biochemical Society Transactions, 2001. **29**(2): p. 272-278.
140. Caradonna, K.L., et al., *Host metabolism regulates intracellular growth of Trypanosoma cruzi*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(1): p. 108-17.

141. Kleshchenko, Y.Y., et al., *Human galectin-3 promotes Trypanosoma cruzi adhesion to human coronary artery smooth muscle cells*. Infection and immunity, 2004. **72**(11): p. 6717-6721.
142. Claser, C., et al., *Silencing cytokeratin 18 gene inhibits intracellular replication of Trypanosoma cruzi in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes*. BMC cell biology, 2008. **9**(1): p. 1.
143. Nagajyothi, F., et al., *Trypanosoma cruzi utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(2): p. e953.
144. Simmons, K.J., et al., *Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks Trypanosoma cruzi infection*. FEBS letters, 2006. **580**(9): p. 2365-2370.
145. Nde, P.N., et al., *Silencing of the laminin γ -1 gene blocks Trypanosoma cruzi infection*. Infection and immunity, 2006. **74**(3): p. 1643-1648.
146. Vieira, M., et al., *Cellular signaling during the macrophage invasion by Trypanosoma cruzi*. Histochem Cell Biol, 2002. **118**(6): p. 491-500.
147. Mukherjee, S., et al., *Alterations in myocardial gene expression associated with experimental Trypanosoma cruzi infection*. Genomics, 2008. **91**(5): p. 423-432.
148. Goldenberg, R.C., et al., *Transcriptomic alterations in Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes*. Microbes Infect, 2009. **11**(14-15): p. 1140-9.
149. 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.
150. Vaena de Avalos, S., et al., *Immediate/early response to Trypanosoma cruzi infection involves minimal modulation of host cell transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 639-44.
151. Mukherjee, S., et al., *Alterations in myocardial gene expression associated with experimental Trypanosoma cruzi infection*. Genomics, 2008. **91**(5): p. 423-32.
152. Soares, M.B., et al., *Gene expression changes associated with myocarditis and fibrosis in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy*. J Infect Dis, 2010. **202**(3): p. 416-26.
153. Manque, P.A., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes*. Infect Immun, 2011. **79**(5): p. 1855-62.
154. Costales, J.A., J.P. Daily, and B.A. Burleigh, *Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in Trypanosoma cruzi-infected host cells by comparative mRNA profiling*. BMC genomics, 2009. **10**(1): p. 1.
155. Mukherjee, S., et al., *Trypanosoma cruzi infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5274-82.
156. Sturm, N.R. and D.A. Campbell, *Alternative lifestyles: the population structure of Trypanosoma cruzi*. Acta tropica, 2010. **115**(1): p. 35-43.

157. Contreras, V.T., et al., *Biological aspects of the Dm 28c clone of Trypanosoma cruzi after metacyclogenesis in chemically defined media*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1988. **83**(1): p. 123-33.
158. Lu M., V.A., *Harvest and Culture of Mouse Peritoneal Macrophages*. Bio-protocol, 2013. **3**(22).
159. Garcia-Silva, M.R., et al., *Extracellular vesicles shed by Trypanosoma cruzi are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells*. Parasitol Res, 2014. **113**(1): p. 285-304.
160. Karlsson, J.-O., et al., *A method for protein assay in Laemmli buffer*. Analytical biochemistry, 1994. **219**(1): p. 144-146.
161. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
162. Piñeyro, M.a.D., et al., *Crystal structure of the tryparedoxin peroxidase from the human parasite Trypanosoma cruzi*. Journal of structural biology, 2005. **150**(1): p. 11-22.
163. De Chaumont, F., et al., *Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research*. Nature methods, 2012. **9**(7): p. 690-696.
164. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method*. Nature protocols, 2008. **3**(6): p. 1101-1108.
165. Team, R.C., *R: A language and environment for statistical computing*. 2013.
166. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote*. Nucleic acids research, 2013. **41**(10): p. e108-e108.
167. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics, 2010. **26**(1): p. 139-40.
168. Langmead, B., et al., *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biol, 2009. **10**(3): p. R25.
169. Mortazavi, A., et al., *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 621-8.
170. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome biology, 2014. **15**(12): p. 1.
171. Chiribao, M.L., et al., *Early Trypanosoma cruzi infection reprograms human epithelial cells*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 439501.
172. Fernandes, M.C., et al., *Novel strategy in Trypanosoma cruzi cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains*. International journal for parasitology, 2007. **37**(13): p. 1431-1441.
173. Ferreira, D., et al., *Actin cytoskeleton-dependent and-independent host cell invasion by Trypanosoma cruzi is mediated by distinct parasite surface molecules*. Infection and immunity, 2006. **74**(10): p. 5522-5528.

174. Schenkman, S., E.S. Robbins, and V. Nussenzweig, *Attachment of Trypanosoma cruzi to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton*. Infect Immun, 1991. **59**(2): p. 645-54.
175. 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.
176. Burleigh, B.A. and N.W. Andrews, *The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells*. Annu Rev Microbiol, 1995. **49**: p. 175-200.
177. Taguchi, K., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution*. Genes Cells, 2011. **16**(2): p. 123-40.
178. Costales, J.A., J.P. Daily, and B.A. Burleigh, *Cytokine-dependent and-independent gene expression changes and cell cycle block revealed in Trypanosoma cruzi-infected host cells by comparative mRNA profiling*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 252.
179. Garg, N., V.L. Popov, and J. Papaconstantinou, *Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in Trypanosoma cruzi-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1638**(2): p. 106-20.
180. Huang, S., et al., *Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma*. Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 125-34.
181. Varfolomeev, E., et al., *c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24295-9.
182. Chittenden, T., et al., *Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak*. Nature, 1995. **374**(6524): p. 733-6.
183. Kasahara, E., et al., *Manganese superoxide dismutase protects against oxidation-induced apoptosis in mouse retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration*. Investigative ophthalmology & visual science, 2005. **46**(9): p. 3426.
184. Mechta-Grigoriou, F., D. Gerald, and M. Yaniv, *The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2378-89.
185. Zhou, B.B. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: putting checkpoints in perspective*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 433-9.
186. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
187. Paull, T.T., et al., *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. Curr Biol, 2000. **10**(15): p. 886-95.
188. Wu, Z.H., et al., *Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli*. Science, 2006. **311**(5764): p. 1141-6.

189. Wuerzberger-Davis, S.M., et al., *NF-kappaB activation by combinations of NEMO SUMOylation and ATM activation stresses in the absence of DNA damage*. *Oncogene*, 2007. **26**(5): p. 641-51.
190. Novelli, G., et al., *[New insights in atherosclerosis research: LOX-1, leading actor of cardiovascular diseases]*. *Clin Ter*, 2007. **158**(3): p. 239-48.
191. D'Avila, H., et al., *Host cell lipid bodies triggered by Trypanosoma cruzi infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E2 generation and increased parasite growth*. *Journal of Infectious Diseases*, 2011. **204**(6): p. 951-961.
192. Dillon, L.A., et al., *Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during Leishmania major differentiation*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(14): p. 6799-813.
193. Atwood, J., et al., *The Trypanosoma cruzi proteome*. *Science*, 2005. **309**(5733): p. 473-476.
194. Bente, M., et al., *Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite Leishmania donovani*. *Proteomics*, 2003. **3**(9): p. 1811-1829.
195. Urbaniak, M.D., M.L.S. Guther, and M.A. Ferguson, *Comparative SILAC proteomic analysis of Trypanosoma brucei bloodstream and procyclic lifecycle stages*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36619.
196. Mantione, K.J., et al., *Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq*. *Med Sci Monit Basic Res*, 2014. **20**: p. 138-42.
197. Frasch, A., *Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 2000. **16**(7): p. 282-286.
198. Schenkman, S., et al., *A novel cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells*. *Cell*, 1991. **65**(7): p. 1117-1125.
199. Cuevas, I.C., J.J. Cazzulo, and D.O. Sánchez, *gp63 homologues in Trypanosoma cruzi: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection*. *Infection and immunity*, 2003. **71**(10): p. 5739-5749.
200. Carranza, J.C., et al., *Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in Trypanosoma cruzi isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes*. *J Bioenerg Biomembr*, 2009. **41**(3): p. 299-308.
201. Nickel, W., *The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(10): p. 2109-19.
202. Bossard, G., G. Cuny, and A. Geiger, *Secreted proteases of Trypanosoma brucei gambiense: possible targets for sleeping sickness control?* *Biofactors*, 2013. **39**(4): p. 407-14.
203. Garcia-Silva, M.R., et al., *Gene expression changes induced by Trypanosoma cruzi shed microvesicles in mammalian host cells: relevance of tRNA-derived halves*. *BioMed research international*, 2014. **2014**.
204. Silverman, J.M., et al., *Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani*. *Genome Biol*, 2008. **9**(2): p. R35.

205. Sant'Anna, C., et al., *Subcellular proteomics of Trypanosoma cruzi reservosomes*. Proteomics, 2009. **9**(7): p. 1782-1794.
206. Riddell, J.R., et al., *Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 1022-30.
207. Pathan, M., et al., *FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool*. Proteomics, 2015. **15**(15): p. 2597-601.
208. Hetz, C., *The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond*. Nature reviews Molecular cell biology, 2012. **13**(2): p. 89-102.
209. Hassan, G.S., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces proliferation of vascular smooth muscle cells*. Infection and immunity, 2006. **74**(1): p. 152-159.
210. Mukherjee, S., et al., *Trypanosoma cruzi infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells*. Infection and immunity, 2004. **72**(9): p. 5274-5282.
211. Muskhelishvili, L., et al., *Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67 (MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2003. **51**(12): p. 1681-1688.
212. Wyllie, D.H., et al., *Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7125-32.
213. Meyer, M., R. Schreck, and P.A. Baeuerle, *H2O2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor*. The EMBO journal, 1993. **12**(5): p. 2005.
214. Palacios, R., *Concanavalin A triggers T lymphocytes by directly interacting with their receptors for activation*. The Journal of Immunology, 1982. **128**(1): p. 337-342.
215. Cosmi, L., et al., *T helper cells plasticity in inflammation*. Cytometry A, 2014. **85**(1): p. 36-42.
216. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 4-12.
217. Stecconi-Silva, R.B., W.K. Andreoli, and R.A. Mortara, *Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003. **98**(7): p. 953-8.
218. Andrade, L.O. and N.W. Andrews, *The Trypanosoma cruzi–host-cell interplay: location, invasion, retention*. Nature Reviews Microbiology, 2005. **3**(10): p. 819-823.
219. Epting, C.L., B.M. Coates, and D.M. Engman, *Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Experimental parasitology, 2010. **126**(3): p. 283-291.
220. Yoshida, N., *Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc, 2006. **78**(1): p. 87-111.

221. Burleigh, B.A. and A.M. Woolsey, *Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion*. Cell Microbiol, 2002. **4**(11): p. 701-11.
222. 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.
223. Kayama, H. and K. Takeda, *The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection*. Microbes Infect, 2010. **12**(7): p. 511-7.
224. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(6): p. 3369-3376.
225. Akira, S. and T. Kishimoto, *IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection*. Immunol Rev, 1992. **127**: p. 25-50.
226. Guo, L., X. Li, and Q.-Q. Tang, *Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β* . Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(2): p. 755-761.
227. Tanaka, T., et al., *Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages*. Cell, 1995. **80**(2): p. 353-61.
228. Bettes, J., et al., *The role of NF-KB and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene expression by interleukin-1 and interleukin-6*. J. Biol. Chem., 1993. **268**: p. 25624-25631.
229. Matsusaka, T., et al., *Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(21): p. 10193-10197.
230. Laskay, T., G. Van Zandbergen, and W. Solbach, *Neutrophil granulocytes—Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?* Trends in microbiology, 2003. **11**(5): p. 210-214.
231. Houston-Ludlam, G.A., A.T. Belew, and N.M. El-Sayed, *Comparative Transcriptome Profiling of Human Foreskin Fibroblasts Infected with the Sylvio and Y Strains of Trypanosoma cruzi*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0159197.
232. Hall, B.S., et al., *Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite Trypanosoma cruzi promotes resistance to intracellular infection*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 153-60.
233. Campos, M.A. and R.T. Gazzinelli, *Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors*. Mediators of inflammation, 2004. **13**(3): p. 139-143.
234. Wuerzberger-Davis, S., et al., *NF- κ B activation by combinations of NEMO SUMOylation and ATM activation stresses in the absence of DNA damage*. Oncogene, 2007. **26**(5): p. 641-651.
235. Simon, H.-U., A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, *Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction*. Apoptosis, 2000. **5**(5): p. 415-418.

236. Roos, W.P. and B. Kaina, *DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis*. Cancer letters, 2013. **332**(2): p. 237-248.
237. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-190.
238. Obata, H., et al., *NF-kappa B is induced in the nuclei of cultured rat aortic smooth muscle cells by stimulation of various growth factors*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **224**(1): p. 27-32.
239. Kaltschmidt, B., et al., *Repression of NF-kappaB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators*. Oncogene, 1999. **18**(21): p. 3213-25.
240. Coppe, J.P., et al., *The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression*. Annu Rev Pathol, 2010. **5**: p. 99-118.
241. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 729-40.
242. Evan, G.I. and F.d.A. di Fagagna, *Cellular senescence: hot or what?* Current opinion in genetics & development, 2009. **19**(1): p. 25-31.
243. Saka, H.A. and R. Valdivia, *Emerging roles for lipid droplets in immunity and host-pathogen interactions*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 411-37.
244. Melo, R.C. and A.M. Dvorak, *Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy?* PLoS Pathog, 2012. **8**(7): p. e1002729.
245. Kumar, Y., J. Cocchiario, and R.H. Valdivia, *The obligate intracellular pathogen Chlamydia trachomatis targets host lipid droplets*. Current Biology, 2006. **16**(16): p. 1646-1651.
246. D'Avila, H., et al., *Host cell lipid bodies triggered by Trypanosoma cruzi infection and enhanced by the uptake of apoptotic cells are associated with prostaglandin E(2) generation and increased parasite growth*. J Infect Dis, 2011. **204**(6): p. 951-61.
247. Michelin, M.A., J.S. Silva, and F.Q. Cunha, *Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental Trypanosoma cruzi infection*. Exp Parasitol, 2005. **111**(2): p. 71-9.
248. Campbell, L.A., et al., *Chlamydia pneumoniae binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells*. Microbes Infect, 2012. **14**(1): p. 43-9.
249. Mehta, J.L., et al., *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders*. Cardiovascular research, 2006. **69**(1): p. 36-45.
250. Feeney, E.R., et al., *The expression of cholesterol metabolism genes in monocytes from HIV-infected subjects suggests intracellular cholesterol accumulation*. Journal of Infectious Diseases, 2012: p. jis723.
251. Kapadia, S.B., et al., *Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I*. Journal of virology, 2007. **81**(1): p. 374-383.

252. Pandey, A.K. and C.M. Sasseti, *Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4376-80.
253. Lafont, F., et al., *Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction*. The EMBO journal, 2002. **21**(17): p. 4449-4457.
254. Cao, F., et al., *Chlamydia pneumoniae-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2*. Infect Immun, 2007. **75**(2): p. 753-759.
255. Robibaro, B., et al., *Toxoplasma gondii Rab5 enhances cholesterol acquisition from host cells*. Cellular microbiology, 2002. **4**(3): p. 139-152.
256. Nishikawa, Y., et al., *Host cholesterol synthesis contributes to growth of intracellular Toxoplasma gondii in macrophages*. Journal of Veterinary Medical Science, 2011. **73**(5): p. 633-639.
257. Rabhi, I., et al., *Transcriptomic signature of Leishmania infected mice macrophages: a metabolic point of view*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(8): p. e1763.
258. Liao, Z., et al., *Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1*. AIDS research and human retroviruses, 2001. **17**(11): p. 1009-1019.
259. Lafont, F. and F.G. Van Der Goot, *Bacterial invasion via lipid rafts*. Cellular microbiology, 2005. **7**(5): p. 613-620.
260. Pike, L.J., *Lipid rafts bringing order to chaos*. Journal of lipid research, 2003. **44**(4): p. 655-667.
261. Korn, E.D., T. Von Brand, and E.J. Tobie, *The sterols of Trypanosoma cruzi and Crithidia fasciculata*. Comp Biochem Physiol, 1969. **30**(4): p. 601-10.
262. Liendo, A., et al., *Sterol composition and biosynthesis in Trypanosoma cruzi amastigotes*. Mol Biochem Parasitol, 1999. **104**(1): p. 81-91.
263. Sunnemark, D., et al., *Induction of early atherosclerosis in CBA/J mice by combination of Trypanosoma cruzi infection and a high cholesterol diet*. Atherosclerosis, 2000. **153**(2): p. 273-82.
264. Han, J.M., et al., *Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway*. Cell, 2012. **149**(2): p. 410-424.
265. Lee, S.W., et al., *Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation*. Journal of cell science, 2004. **117**(17): p. 3725-3734.
266. Wakasugi, K. and P. Schimmel, *Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase*. Science, 1999. **284**(5411): p. 147-151.
267. Bringaud, F., L. Riviere, and V. Coustou, *Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources*. Mol Biochem Parasitol, 2006. **149**(1): p. 1-9.
268. Cannata, J.J. and J.J. Cazzulo, *The aerobic fermentation of glucose by Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B, 1984. **79**(3): p. 297-308.

269. Silber, A.M., et al., *Glucose uptake in the mammalian stages of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 2009. **168**(1): p. 102-8.
270. Malliopoulou, V., et al., *High glucose protects embryonic cardiac cells against simulated ischemia*. Mol Cell Biochem, 2006. **284**(1-2): p. 87-93.
271. Naderer, T., J. Heng, and M.J. McConville, *Evidence that intracellular stages of Leishmania major utilize amino sugars as a major carbon source*. PLoS Pathog, 2010. **6**(12): p. e1001245.
272. Berman, J.D., et al., *Uptake, distribution, and oxidation of fatty acids by Leishmania mexicana amastigotes*. The Journal of parasitology, 1987: p. 555-560.
273. Kramer, S. and M. Carrington, *Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids*. Trends Parasitol, 2011. **27**(1): p. 23-30.
274. D'Orso, I., J.G. De Gaudenzi, and A.C. Frasch, *RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes*. Trends in parasitology, 2003. **19**(4): p. 151-155.
275. Rosenzweig, D., et al., *Post-translational modification of cellular proteins during Leishmania donovani differentiation*. Proteomics, 2008. **8**(9): p. 1843-1850.
276. Torrecilhas, A.C.T., et al., *Trypanosoma cruzi: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response*. Microbes and Infection, 2009. **11**(1): p. 29-39.
277. Takahashi, S., et al., *Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 17): p. 4049-57.
278. Furuta, T., et al., *Mast cell-mediated immune responses through IgE antibody and Toll-like receptor 4 by malarial peroxiredoxin*. European journal of immunology, 2008. **38**(5): p. 1341-1350.
279. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell research, 2002. **12**(1): p. 9-18.
280. Dvorak, J.A. and M.S. Crane, *Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites*. Science, 1981. **214**(4524): p. 1034-6.
281. Yang, H.-T., P. Cohen, and S. Rousseau, *IL-1 β -stimulated activation of ERK1/2 and p38 α MAPK mediates the transcriptional up-regulation of IL-6, IL-8 and GRO- α in HeLa cells*. Cellular signalling, 2008. **20**(2): p. 375-380.
282. Soares-Silva, M., et al., *The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 183.
283. Rong, X., et al., *LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition*. Cell Metab, 2013. **18**(5): p. 685-97.
284. Hu, P., et al., *Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49420-9.

285. Sasu, S., et al., *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circulation research*, 2001. **89**(3): p. 244-250.
286. Rhee, S.G. and H.A. Woo, *Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones*. *Antioxidants & redox signaling*, 2011. **15**(3): p. 781-794.
287. Teixeira, F., et al., *Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in Leishmania infantum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(7): p. E616-24.
288. Kimura, R., et al., *2-Cys peroxiredoxin of Plasmodium falciparum is involved in resistance to heat stress of the parasite*. *Parasitol Int*, 2013. **62**(2): p. 137-43.
289. Jang, H.H., et al., *Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function*. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 625-635.
290. Kunsch, C. and C.A. Rosen, *NF-kappa B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(10): p. 6137-46.
291. Macchia, G., et al., *The Hsp60 protein of Helicobacter pylori: structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases*. *Mol Microbiol*, 1993. **9**(3): p. 645-52.
292. Tsukamoto, H., et al., *Multiple potential regulatory sites of TLR4 activation induced by LPS as revealed by novel inhibitory human TLR4 mAbs*. *International immunology*, 2012. **24**(8): p. 495-506.
293. Mamat, U., et al., *Detoxifying Escherichia coli for endotoxin-free production of recombinant proteins*. *Microbial cell factories*, 2015. **14**(1): p. 1.
294. Swaroop, S., et al., *HSP60 plays a regulatory role in IL-1 β -induced microglial inflammation via TLR4-p38 MAPK axis*. *Journal of neuroinflammation*, 2016. **13**(1): p. 1.
295. Planesse, C., et al., *Recombinant human HSP60 produced in ClearColi BL21(DE3) does not activate the NFkappaB pathway*. *Cytokine*, 2015. **73**(1): p. 190-5.
296. Habich, C., et al., *Heat shock protein 60: specific binding of lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 2005. **174**(3): p. 1298-305.
297. Niimi, T., *Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite Leishmania tarentolae: a review*. *Recombinant Gene Expression*, 2012: p. 307-315.
298. Ribeiro, M., et al., *Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase*. *Parasite Immunology*, 2000. **22**(1): p. 49-53.
299. Ruiz Diaz, P., et al., *Trypanosoma cruzi trans-sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and downregulates Th1 effector cells*. *Infect Immun*, 2015. **83**(5): p. 2099-108.
300. Hoft, D.F., et al., *Trans-sialidase recombinant protein mixed with CpG motif-containing oligodeoxynucleotide induces protective mucosal and systemic Trypanosoma cruzi immunity involving CD8⁺ CTL and B cell-mediated cross-priming*. *The Journal of Immunology*, 2007. **179**(10): p. 6889-6900.

301. Costa, F., et al., *Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces Trypanosoma cruzi infection in mice*. Vaccine, 1998. **16**(8): p. 768-774.
302. Guiñazú, N., et al., *Immune response to a major Trypanosoma cruzi antigen, cruzipain, is differentially modulated in C57BL/6 and BALB/c mice*. Microbes and infection, 2004. **6**(14): p. 1250-1258.
303. Schnapp, A.R., et al., *Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against Trypanosoma cruzi in mice*. Infection and immunity, 2002. **70**(9): p. 5065-5074.
304. Loke, P.n., et al., *IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype*. BMC immunology, 2002. **3**(1): p. 1.
305. Weidenbusch, M. and H.J. Anders, *Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis*. J Innate Immun, 2012. **4**(5-6): p. 463-77.
306. Accarias, S., et al., *Single-cell analysis reveals new subset markers of murine peritoneal macrophages and highlights macrophage dynamics upon Staphylococcus aureus peritonitis*. Innate Immunity, 2016: p. 1753425916651330.
307. Laucella, S.A., et al., *Frequency of interferon- γ -producing T cells specific for Trypanosoma cruzi inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease*. Journal of Infectious Diseases, 2004. **189**(5): p. 909-918.