## Tesis de Doctorado PEDECIBA Biología

## Subárea Biología Celular y Molecular

Bases moleculares de la cardiomiopatía chagásica humana: la interacción *Trypanosoma cruzi* - cardiomiocito.

MSc. Q.F. María Gabriela Libisch Recalde

Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo

**Orientador: Dr. Carlos Robello** 

Montevideo, Abril 2020

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS
RESUMEN7
INTRODUCCIÓN9
Trypanosoma cruzi9
Generalidades9
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> 10
Enfermedad de Chagas11
Cardiomiopatía chagásica crónica - CCC14
Metabolismo energético y cardiomiopatía chagásica15
mTORC1 y su relación con el metabolismo energético y la enfermedad de Chagas18
ROS, mTORC1 y Senescencia20
Repuesta inflamatoria contra <i>T. cruzi</i> 22
Terapias dirigidas al hospedero24
Interacción <i>T. cruzi</i> – célula hospedera27
Familias multigénicas del parásito28
Moléculas del hospedero involucradas en la invasión
Mecanismos de Invasión30
Respuesta transcripcional de células infectadas con <i>T. cruzi</i>
OBJETIVOS
GENERAL
ESPECÍFICOS
MATERIALES Y MÉTODOS
Cultivos celulares
Cultivo de parásitos

Extracción de ARN y Microarreglos
Análisis informático
Transcripción reversa y PCR cuantitativa (qRTPCR)41
Estudio de proliferación celular42
Western blot y ensayos de inmunofluorescencia43
ELISA44
Medición del Perfil Bioenergético44
Determinación de especies reactivas del oxígeno46
Estudio del impacto de fármacos sobre la infección/replicación del parásito46
Evaluación de la β-galactosidasa asociada a senescencia en solución47
Medida de glucosa y lactato en sobrenadante de cultivo47
Determinación del porcentaje de infección /replicación
Análisis estadísticos
RESULTADOS
Resultados relacionados con los Objetivos 1 y 250
Genes relacionados a las vías del metabolismo energético y síntesis de proteínas se sobre-expresan en cardiomiocitos infectados50
La respiración mitocondrial está elevada en cardiomiocitos infectados54
La infección de cardiomiocitos humanos con <i>T. cruzi</i> induce un aumento del contenido mitocondrial58
Activación de la vía AKT/mTORC1 en cardiomiocitos infectados61
Resultados relacionados al Objetivo 366
Evaluación de fármacos que interfieren con el metabolismo energético66
Resultados relacionados al Objetivo 469
La respuesta de las células hospederas a la infección por <i>T. cruzi</i> se caracteriza por regular cientos de genes69
La respuesta de la célula hospedera a la infección por <i>T. cruzi</i> es principalmente célula - específica73

Las vías relacionadas con la respuesta inmune/inflamatoria son las más sobre- representadas en células epiteliales y macrófagos
<i>T. cruzi</i> es capaz de inducir características senescentes
Los macrófagos infectados sub-expresan genes relacionados a la síntesis del colesterol82
Resultados relacionados a aspectos metodológicos84
DISCUSIÓN86
Respuesta de cardiomiocitos primarios humanos a la infección con T. cruzi86
Evaluación de fármacos que interfieren con el metabolismo energético92
Comparación de la respuesta de células humanas infectadas con T. cruzi94
CONCLUSIONES
PERSPECTIVAS104
BIBLIOGRAFÍA106
ANEXOS
Anexo 1
Anexo 2
ADDEDUM120

# AGRADECIMIENTOS

A Malón, por la libertad que da para trabajar, el tiempo dedicado y todo lo aprendido en estos años.

A los Dres. Beatriz Garat, Celia Quijano y Ariel Silber por acceder a ser parte del tribunal de esta tesis.

A todas mis compañeras y compañeros de la UBM, gracias por brindar tan buena y enriquecedora compañía.

A Ma. Laura, Paula, Natalia y Florencia de la UBM, a ellas un especial agradecimiento por ayudarme con distintos aspectos de esta tesis.

A Lucía Piacenza, del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, por ayudarme con los experimentos relacionados al metabolismo energético y por su buena onda.

Al Institut Pasteur de Montevideo y la ANII por el apoyo económico.

A mis amigas que tanto quiero y tanto me bancan.

A mi familia, particularmente a mi madre y mi padre por su apoyo incondicional.

A Gabriel y nuestros tres hijos Santi, Guille y Lucas, por ser mi principal motor.

A todos muchas gracias!!!

## RESUMEN

## RESUMEN

La cardiopatía chagásica crónica es una de las manifestaciones más frecuentes y graves de la enfermedad de Chagas, causada por el parásito Trypanosoma cruzi. Los mecanismos bioquímicos y patogénicos responsables de esta enfermedad aún no están completamente dilucidados. En este trabajo, evaluamos la respuesta inicial de los cardiomiocitos humanos a la infección por T. cruzi. Encontramos que los cardiomiocitos cambian drásticamente su perfil de expresión génica en las etapas iniciales de la infección, aumentando la expresión de genes relacionados al metabolismo energético. Demostramos que estos cambios se correlacionan funcionalmente con un incremento en la respiración mitocondrial, dado que observamos un aumento en la respiración basal y máxima de los cardiomiocitos infectados, así como una mayor reserva respiratoria. También encontramos un aumento de la biogénesis mitocondrial independente de PGC-1 $\alpha$ , un regulador del metabolismo energético. Demostramos que estos cambios están mediados por mTORC1 y se revierten al utilizar rapamicina. Los resultados del presente trabajo identifican que a tiempos cortos de infección, la activación de mTORC1, la biogénesis mitocondrial y el aumento de la respiración son cambios bioquímicos destacables en el desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica. Estos cambios se asemejan a los encontrados en la cardiopatía hipertrófica no chagásica mientras que se diferencian de los encontrados en la cardiopatía dilatada. El hallazgo de que los cambios en la respiración mitocondrial puedan revertirse mediante el uso de rapamicina, abre una nueva perspectiva en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, a través de la identificación de blancos terapéuticos, no sólo en el parásito, sino también en el hospedero, lo que podría permitir el uso de terapias combinadas (dirigidas hacia el parásito y al hospedero) que puedan prevenir el desarrollo de esta enfermedad. Con tal fin evaluamos cambios generados en la infección/replicación del parásito, frente a fármacos, algunos de ellos aprobados por la FDA, que intervienen directa o indirectamente con el metabolismo energético del hospedero. Finalmente, nos propusimos analizar si la respuesta de los cardiomiocitos a la infección involucra aspectos exclusivos de este tipo celular así como aspectos más generales. Con tal fin comparamos dicha respuesta con la observada en trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio, con modelos de infección en células epiteliales, representando la primer barrera que enfrenta el parásito, así como en macrófagos, los cuales juegan un rol fundamental en la respuesta inmune contra T. cruzi.

En resumen, el trabajo realizado contribuye al entendimiento de las bases moleculares de los procesos involucrados en la interacción cardiomiocito humano - *Trypanosoma cruzi*.

# INTRODUCCIÓN

# INTRODUCCIÓN

### Trypanosoma cruzi

#### Generalidades

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un protozoario flagelado kinetoplástido, que pertenece a la familia Trypanosomatidae. Dentro de sus características biológicas se destaca la presencia de una mitocondria única y altamente ramificada que se extiende por todo el cuerpo del parásito, y 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 [1]. En relación al genoma de T. cruzi, el mismo varía en tamaño dependiendo de la cepa y el linaje, contiene sus genes organizados en tándem y transcriptos como policistrones; salvo excepciones, los genes no contienen intrones. Los genes de un policistrón no tienen necesariamente una asociación funcional ni niveles de expresión similares a lo largo del ciclo de vida, debido a que no existe una regulación transcripcional clásica de inicio de la transcripción [2]. El genoma presenta un alto porcentaje de secuencias repetidas (más del 50%) muchas de ellas debidas a la presencia de variadas familias multigénicas que juegan un rol fundamental en los procesos de infección del parásito [3]. Los pre-ARNm sufren un proceso de maduración llamado "trans-splicing"; este ARNm se poliadenila en 3' y todos los ARNm maduros llevan hacia 5' una secuencia conocida como SL (spliced leader o mini-exón). Otra característica de este genoma es que no se han podido identificar secuencias promotoras de la transcripción para los genes que codifican proteínas. La regulación de la expresión génica opera principalmente post-transcripcionalmente, incluyendo mecanismos como el procesamiento y degradación del ARN mensajero, eficiencia de la traducción, estabilidad y degradación proteica [4]. Todas estas características ponen de manifiesto la alta complejidad genómica de T. cruzi, lo que le otorga una gran plasticidad y por lo tanto tiene la capacidad de generar una diversidad muy grande de clones con características muy diferentes entre sí, lo que posiblemente le permita como especie adaptarse a sus diferentes hospederos, e invadir casi todos los tipos de células nucleadas, ya sean fagocíticas o no fagocíticas.

Por otra parte, las distintas cepas de *T. cruzi* poseen diferencias en cuanto a la tasa de crecimiento, curvas de parasitemia, virulencia, sensibilidad a fármacos, perfiles genéticos, tropismo celular, distribución geográfica, entre otros [5-9]. Se han clasificado las distintas cepas de *T. cruzi* en seis grupos principales, conocidos como unidades discretas de tipificación denominadas DTU (*"Discrete Typing Units"*). Este término fue propuesto para describir un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa. Actualmente se acepta que existen al menos seis DTUs (TcI a TcVI), siendo las primeras cuatro linajes no híbridos, y TcV y TcVI híbridos de TcII y TcIII [10]. Sin embargo, la alta diversidad genética y biológica de las cepas de *T. cruzi*, inclusive a nivel intra-DTU, indican que las DTUs constituyen una definición útil pero no definitiva [11].

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

T. cruzi presenta cuatro estadios de vida bien diferenciados y su ciclo se desarrolla en un insecto vector y un hospedero mamífero (Figura 1). Durante el ciclo de vida de T. cruzi, el insecto vector triatomino hematófago, se alimenta de la sangre de un mamífero infectado ingiriendo tripomastigotas (forma infectiva, no replicativa del parásito). En el intestino medio del insecto, los tripomastigotas se transforman en epimastigotas (forma replicativa, no infectiva) 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 [12, 13]. Existen varios factores capaces de promover la diferenciación de los epimastigotas, como el estrés nutricional, la presencia de algunos aminoácidos (por ejemplo prolina y glutamina), la osmolaridad y el estado redox del entorno [14]. Una vez diferenciados, los tripomastigotas metacíclicos son liberados con las heces cuando el insecto pica a una persona u otro mamífero. Las heces quedan depositadas sobre la piel, que luego, con el rascado (o la contaminación de la mucosa nasal, oral o conjuntiva [15]) pueden ingresar al torrente sanguíneo. Una vez dentro del hospedero los tripomastigotas son capaces de invadir muchos tipos celulares diferentes volviendo a sufrir una transformación a la forma amastigota, la cual es la forma principal intracelular redondeada y capaz de replicarse por fisión binaria. 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* [16, 17]. Los amastigotas comienzan a dividirse dentro del citoplasma de la célula y cuando alcanzan una alta densidad (3-5 días post infección), se transforman nuevamente en tripomastigotas los cuales lisan la célula y se liberan al torrente sanguíneo o linfa infectando nuevas células. Las células lisadas prematuramente liberan amastigotas los cuales también son capaces de invadir otras células diseminando la infección [18] o ser ingeridos por un insecto vector, cerrando el ciclo.



Figura 1: Representación del ciclo de vida de Trypanosoma cruzi. Extraído de [19]

### Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue descrita por primera vez en 1909 por el médico e investigador brasileño Carlos Justiniano Ribeiro Chagas [20]. Representa un problema de salud pública en América Latina, afectando entre 6 - 7 millones de personas y es considerada por la Organización Mundial de la Salud, una enfermedad desatendida (https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-

(americantrypanosomiasis). Tradicionalmente se asocia con áreas pobres rurales, en América del Sur y Central, dado que el insecto que transmite la enfermedad tiende a infestar casas hechas de techos de paja y paredes de barro. El parásito se transmite a los humanos y otros mamíferos principalmente mediante la picadura de insectos vectores hematófagos triatominos. Adicionalmente, la enfermedad de Chagas también puede transmitirse por mecanismos no vectoriales, que incluyen la transfusión sanguínea, la transmisión vertical de la madre al feto, el trasplante de órganos o de médula ósea, así como también la transmisión oral a través de alimentos contaminados [21].

Desde 1990, Latinoamérica ha logrado establecer políticas de control de la enfermedad exitosas. La prevalencia global estimada de infección por *T. cruzi* disminuyó de 18 millones en 1991 a 6 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. 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 (Figura 2) [22-24].



Figura 2: Mapa representando los países endémicos y no endémicos para la enfermedad de Chagas. Extraído de http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/

Desde el punto de vista clínico, la infección con *T. cruzi* genera inicialmente una infección aguda que suele resolverse de manera espontánea en las primeras 4-8 semanas. Los pacientes en esta etapa presentan una parasitemia elevada, y suele ser asintomática o presentar algunos síntomas inespecíficos como fiebre, taquicardia, o dolor muscular, entre otros. El tratamiento en esta etapa con fármacos antiparasitarios es efectivo previniendo el desarrollo de la fase crónica [25]. En la fase crónica y aún en ausencia de tratamiento, cerca del 60-70% de los individuos infectados no desarrollan ninguna sintomatología o daño detectable, aunque presentan anticuerpos IgG contra *T. cruzi*. El otro 30-40% de los individuos luego de un período que puede llevar de 10-30 años, a partir de la infección, presenta manifestaciones cardíacas y un 10% manifestaciones digestivas (megacolon y megaesófago) y/o neurológicas [26]. La forma cardíaca, denominada cardiomiopatía chagásica crónica -CCC- es la manifestación más común y grave de la enfermedad de Chagas y es potencialmente letal [27, 28]. Dependiendo de su severidad, se puede clasificar en leve, moderada o severa [25].

En cuanto al tratamiento, existen dos fármacos capaces de curar la enfermedad en la etapa aguda: Nifurtimox y Benznidazol. Ambos fármacos presentan importantes efectos secundarios (dermatitis alérgica, neuropatías, leucopenia, náuseas, vómitos, anorexia, así como alteraciones en el sistema nervioso central, entre otros) [29]. Si bien el tratamiento es efectivo en la fase aguda de la enfermedad, no es capaz de curar la misma en la fase crónica [30-33]. A pesar de esto, se recomienda el tratamiento en pacientes menores a 50 años cursando la fase indeterminada asintomática de la enfermedad y también en aquellos que presentan sintomatología leve con el fin de evitar el desarrollo de formas severas de la enfermedad [34]. Los últimos resultados del proyecto BENEFIT (*Benznidazol Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*) para evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con Benznidazol en pacientes con CCC, 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 (incluyendo muerte, falla cardíaca, y otros eventos cardiovasculares relevantes) [35].

13

En pacientes con insuficiencia cardíaca refractaria, el único tratamiento disponible es el trasplante de corazón [36].

A pesar de que la enfermedad de Chagas fue descubierta hace más de 100 años, no contamos actualmente con tratamientos alternativos para la fase crónica. Esto es consecuencia de un conocimiento aún limitado sobre su patogénesis, y muestra la necesidad de continuar investigando sobre la misma.

#### Cardiomiopatía chagásica crónica - CCC

La cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) puede presentarse a través de una gran variedad de manifestaciones clínicas como arritmias, palpitaciones, dolor torácico, así como insuficiencia cardíaca. La muerte súbita cardíaca es la causa más común de mortalidad, ya que representa del 50% al 60% de todas las muertes, seguidas de insuficiencia cardíaca [37]. Los primeros signos de la enfermedad son anomalías en la conducción cardíaca, especialmente el bloqueo de la rama derecha y el bloqueo fascicular anterior izquierdo. Los más tardíos incluyen el desarrollo de disfunción del nódulo sinusal, bloqueo auriculoventricular de alto grado, una fibrosis, hipertrofia, y cardiomiopatía dilatada (CMD).

A pesar de diversos esfuerzos, la patogénesis a nivel molecular de la CCC no está aún esclarecida. Esto en parte se debe a que es una enfermedad compleja y multifactorial, en donde tanto efectos directos de la infección de cardiomiocitos, así como la respuesta inmune generada por el hospedero contribuyen al daño progresivo cardíaco. Es importante recordar que, a nivel celular, los componentes principales del corazón son los cardiomiocitos, los fibroblastos cardíacos o cardiofibroblastos, las células endoteliales y las células vasculares de músculo liso. En un corazón adulto normal los cardiomiocitos ocupan la mayoría del volumen tisular, sin embargo, contribuyen sólo al 30% del número total de células. El 70% restante está compuesto por tipos celulares no cardiomiocíticos, entre los cuales los cardiofibroblastos representan la mayoría. Todos estos tipos celulares pueden ser infectados por *T. cruzi*, y el daño que desencadena finalmente una CCC, puede estar dado por la infección directa de cardiomiocitos, así

planteado que en las etapas iniciales de la infección, las primeras interacciones que ocurren son entre los parásitos y las células endoteliales del corazón [38], y las mismas se han propuesto como las responsables de generar vasculitis (inflamación de los vasos sanguíneos del corazón) [39-41]. Luego, en la etapa crónica de la enfermedad, la infección de los cardiomiocitos se vuelve relevante, generando una destrucción de los mismos, los cuales son sustituidos por tejido fibroso, produciéndose también una hipertrofia cardíaca compensatoria, lo que termina provocando una dilatación cardíaca [42, 43]. Por otro lado, una prolongada estimulación de respuestas inflamatorias generadas por el hospedero, también contribuyen con la miocarditis. Particularmente los linfocitos T desatan una respuesta contra el parásito generando citoquinas inflamatorias, predominantemente Interferóny y factor de necrosis tumoral (TNF), ambos importantes para controlar el parásito en la fase aguda; sin embargo, si la respuesta inflamatoria es prolongada, la misma luego puede contribuir al desarrollo de alteraciones cardíacas como la fibrosis, cardiomiopatía hipertrófica (CMH), y posteriormente a una cardiomiopatía dilatada (CMD), falla cardíaca y finalmente muerte en individuos infectados [44, 45]. En cuanto a posibles relaciones entre la carga parasitaria y daño cardíaco, se ha documentado la persistencia de parásitos en diferentes tejidos, incluyendo el cardíaco, y se ha mostrado experimentalmente una correlación directa entre carga parasitaria y zonas de inflamación tisular [46] [47-49]. También hay evidencia de un posible mimetismo de antígenos con reactividad cruzada luego de la infección por T. cruzi y la presencia de auto-anticuerpos contra el hospedero en el tejido nervioso, y el tejido muscular cardíaco y esquelético [50].

En resumen, la persistencia de *T. cruzi* puede desencadenar la mayoría de los mecanismos de patogénesis mencionados anteriormente y múltiples factores relacionados tanto con el hospedero como con el parásito intervienen para determinar la sensibilidad y la progresión hacia la cardiomiopatía [51].

#### Metabolismo energético y cardiomiopatía chagásica.

Dado que el corazón es el órgano que consume más energía en el cuerpo, las alteraciones en la generación de energía pueden llevar a una falla funcional del corazón y perturbaciones en la conducción eléctrica [52]. La fosforilación oxidativa mitocondrial,

utilizando como sustratos ácidos grasos, es esencial para la producción de energía y la función cardíaca [53]. Este proceso comprende varios complejos, los relacionados a la cadena de transporte de electrones (complejos I a IV) y el complejo V o ATP sintasa (Figura 3). En mamíferos, la mayor parte del ATP se sintetiza a través de la fosforilación oxidativa. Ha sido reportado que el daño mitocondrial conduce a la pérdida de la función mitocondrial, al deterioro de la producción de energía y la fisiología celular, generando daño y/o muerte del cardiomiocito [54].



**Figura 3. Esquema de la cadena respiratoria en mamíferos. Tomada de Lehninger sexta edición.** Se representan los complejos involucrados (I, II, III y IV) junto con el complejo V o ATP sintasa. Se muestra el gradiente electroquímico de protones generado por el pasaje de electrones a través de los complejos.

Existen diversos trabajos con aproximaciones transcriptómicas y bioquímicas en diferentes modelos de estudio (ratón, humano), que dan información respecto a cambios relacionados al metabolismo energético en la CCC.

#### Estudios en cardiomiocitos murinos.

En estudios transcriptómicos *in vitro* de cardiomiocitos de ratones, algunos trabajos no han mostrado diferencias significativas respecto a cambios relacionados con el metabolismo energético utilizando las cepas Dm28c y Brasil [55, 56]. En cuanto a

INTRODUCCIÓN

estudios transcriptómicos y por qRTPCR *in vivo* utilizando la cepa Brasil y SylvioX 10/4, se ha observado, en etapas crónicas de la CCC, una disminución en la expresión de genes relacionados con la respiración mitocondrial [57, 58].

Estudios *in vitro* con la cepa CL-Brener, mediante la medida de la respiración mitocondrial, han mostrado disminución en el metabolismo energético en cardiomiocitos de ratones infectados, 24hpi [59]. En modelos *in vivo* con la cepa SylvioX 10/4, distintos estudios bioquímicos en etapas crónicas de la enfermedad, muestran resultados similares [60] [61].

#### Estudios en cardiomiocitos humanos.

En estudios transcriptómicos *in vitro* de cardiomiocitos humanos utilizando la cepa Tulahuen no se encontraron cambios significativos respecto al metabolismo energético [62].

#### Estudios en cardiomiocitos de pacientes con CCC

En cuanto a pacientes con CCC y otras patologías relacionadas, se demostró mediante estudios transcriptómicos que la CCC muestra una respuesta característica específica diferente a otra cardiomiopatía como la cardiomiopatía dilatada - CMD [63]. Particularmente se muestra que los mecanismos relacionados con la fosforilación oxidativa mitocondrial (junto con respuesta inmune, y metabolismo de lípidos) son vías aumentadas exclusivamente en la CCC y no en la CMD. Además, en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica - HCM, un paso crítico en la progresión hacia la CCC, se demostró mediante estudios transcriptómicos, la sobre-expresión de genes de las vías de la síntesis proteica y la fosforilación oxidativa [64]. Por otro lado, en muestras de pacientes con CCC se ha encontrado una disminución en componentes del sistema creatina guinasa, el cual relaciona el ATP producido en la mitocondria con el consumido en procesos citosólicos [65, 66]. Más recientemente, el trabajo de Silva et al. [67] muestra que la vía de PI3Ky (perteneciente a la clase I de PI3K las cuales activan AKT y eventualmente podría inducir un aumento en el metabolismo energético, ver más adelante) está aumentada en pacientes con CCC así como en modelos de ratones infectados con la cepa Y. Finalmente, la presencia de citoquinas inflamatorias en pacientes con CCC pueden también alterar el metabolismo energético. Por ejemplo, IFN-

17

γ puede inhibir el metabolismo oxidativo mitocondrial [68] e incrementar la tasa de agotamiento del ATP en los cardiomiocitos [69]. Estos estudios dejan de manifiesto que las respuestas energéticas encontradas a la infección de cardiomiocitos con *T. cruzi,* son complejas, los resultados obtenidos no son uniformes en los diversos trabajos, γ probablemente dependan del tipo de cepa, del modelo de infección (*in vitro* o *in vivo*) así como la especie (humano o ratón).

#### mTORC1 y su relación con el metabolismo energético y la enfermedad de Chagas.

mTOR (de sus siglas en inglés *mammalian target of rapamycin),* es una serin/treonin quinasa que da lugar a dos complejos proteicos denominados mTORC1 y mTORC2, los cuales regulan distintos procesos celulares. La regulación de ambos complejos depende de la vía de señalización intracelular PI3K/AKT. Las fosfatidilinositol 3quinasas - PI3K de clase I, son un conjunto de enzimas que catalizan la producción de un segundo mensajero lipídico denominado fosfatidilinositol(3,4,5)-trifosfato (PIP3). Esto genera la translocación de la quinasa AKT (proteína quinasa B) a la membrana, donde se activa por la quinasa 1 dependiente de fosfoinositol (PDK1). La fosforilación de AKT promueve la fosforilación e inactivación del inhibidor de mTORC1, TSC2, lo que habilita su activación. Por otro lado, la activación de mTORC2 requiere su asociación con los ribosomas lo cual es estimulado por la actividad de PI3K. La activación de mTORC2 a su vez implica la fosforilación de AKT en la serina 473 [70].

En particular mTORC1 regula procesos como la proliferación celular, síntesis proteica, autofagia, y metabolismo energético. La actividad de mTORC1 puede ser regulada, entre otros compuestos por la rapamicina, la cual es capaz de inhibirlo (sin afectar la actividad de mTORC2). La activación de mTORC1 lleva entre otros, a la fosforilación de p70S6k (proteína ribosomal S6 quinasa) y de la proteína de unión 1 al factor del inicio de la traducción 4E: 4E-BP1. Su fosforilación libera a la proteína de su unión al factor de traducción, permitiéndole iniciar la misma (su fosforilación habilita la traducción) [71]. La fosforilación de ambas moléculas se relaciona con la activación de la síntesis proteica. Particularmente además se ha mostrado que la fosforilación de 4E-BP1 se relaciona con un aumento de la actividad y biogénesis mitocondrial [72] **(Figura 4).** 



#### Metabolismo energético

### **Síntesis Proteica**

**Figura 4. Esquema de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, y sus efectores principales.** (extraída y modificada de: https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/pi3k-akt-mtorpathway). Bajo diferentes señales como factores de crecimiento, PI3K se activa y fosforila AKT. AKT fosforilado inhibe TSC2 por fosforilación, lo que impide que el complejo TSC2/TSC1 se una a RHEB (*RAS homolog enriched in brain*), permitiendo la activación de mTORC1, iniciando una cascada de señales como la fosforilación de S6K y 4E-BP1. Estas señales terminan favoreciendo la síntesis proteica y particularmente la actividad mitocondrial a través de la fosforilación de 4E-BP1. mTORC1 puede ser inhibido por rapamicina y/o análogos de la misma.

En el contexto de infecciones por *T. cruzi,* se ha observado un aumento en la fosforilación de AKT de células del sistema nervioso, como células Schwann humanas [73, 74]. También el tejido adiposo infectado, propuesto como un importante reservorio de parásitos [19], muestra una activación de la vía PI3K/AKT [75]. Finalmente, fibroblastos murinos, macrófagos humanos y murinos infectados [76, 77], células epiteliales [78] y cardiomiocitos de ratón infectados [67] también muestran una activación de la vía

PI3K/AKT. Además, cambios en mTORC1, han sido observados en células epiteliales como las células HeLa [78] y macrófagos murinos infectados [79].

Más recientemente fue demostrado que la vía de PI3Kγ (perteneciente a la clase I de PI3K que activan AKT) está aumentada en pacientes con CCC así como en modelos de ratones infectados. El trabajo también resalta que la activación de esta vía en células mieloides de los ratones infectados es esencial para controlar la parasitemia y que su activación tendría un rol importante en restringir particularmente la carga parasitaria en corazones y en última instancia en evitar la miocarditis y el daño cardíaco [67]. Otro aspecto a destacar de la vía PI3K/AKT/mTOR, es su rol en la sobrevida y reparación de distintos tipos celulares, pudiendo su activación representar una forma que ayuda al parásito a persistir en el hospedero [19].

#### ROS, mTORC1 y Senescencia

Durante el proceso de respiración celular se generan especies reactivas del oxígeno [80], y un aumento moderado de las mismas puede llevar a una activación de mTORC1. A su vez, la activación de mTORC1 vía S6k provoca la fosforilación de HDM2 (regulador del gen supresor tumoral p53). Su fosforilación llevaría a la estabilización de p53 y un aumento de sus blancos, como p21, el cual detiene el ciclo celular, induciendo un fenotipo senescente [81] (Figura 5). El estado de senescencia se genera en respuesta a diferentes tipos de estrés celular y provoca diversos cambios en la célula siendo uno de los más notorios la falta de proliferación y arresto del ciclo celular [82-84]. Dependiendo del tipo celular y los factores de estrés que hayan inducido el estado senescente (disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, daño del ADN vía ATM,, entre otros), se obtendrán variaciones en la respuesta específica de la célula, lo que genera una naturaleza diversa y compleja del perfil senescente. Una de las características de estas células es que son capaces de aumentar el metabolismo oxidativo mitocondrial, dado que tienen una alta demanda energética [85]. A su vez presentan un fenotipo secretor asociado (FSAS) que incluye el aumento de algunas citoquinas y quimioquinas inflamatorias como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular MMPs [85-88]. El FSAS está regulado a nivel transcripcional y post transcripcional. La expresión de muchos de los componentes de FSAS están regulados por los factores de transcripción NF-κB y C/EBPβ [85-88]. La secreción de estos componentes influye en el microambiente, y suelen atraer a células inmunes [89, 90]. Las células senescentes también se caracterizan por presentar cambios sustanciales a nivel nuclear y de la cromatina como la acumulación de focos de heterocromatina asociados a la senescencia [91, 92]. Finalmente, un marcador clásico es el aumento en la actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia, dado el aumento de lisosomas en estas células. La actividad de la enzima puede ser detectada a pH 6 (subóptimo) [93]. Considerando que ninguna de estas características es exclusiva de las células senescentes, se necesita una combinación de distintos factores para definir este perfil. Ha sido descrito que la activación inmune crónica durante la enfermedad de Chagas produce senescencia en células T CD4+ y CD8+ debido al agotamiento celular por la persistencia de T. cruzi en el hospedero [94, 95]. Además, recientemente se ha observado que *T. cruzi* es capaz de inducir un fenotipo senescente en fibroblastos infectados, los cuales sobreexpresan β-galactosidasa, así como producen citoquinas asociadas al fenotipo secretor senescente. También aumentan la producción de especies reactivas del oxígeno y disminuyen su proliferación [96].



Figure 5. Esquema de la interconexión entre mTORC1 y estrés oxidativo mitocondrial en la generación de senescencia. Tomado de [81]. Existen diversas señales capaces de activar mTORC1 (líneas azules). A su vez el estrés oxidativo y la función mitocondrial se proponen como

reguladores adicionales de mTORC1, capaces de generar una detención del crecimiento celular induciendo un estado de senescencia mediado por la quinasa p70S6K, la cual es capaz de modular la actividad de HDM2 y consecuentemente de p53. Estas conexiones se muestran en rojo.

#### Repuesta inflamatoria contra T. cruzi

La respuesta inmune del hospedero frente a *T. cruzi* en la etapa aguda es efectiva para controlar la carga parasitaria, pero no elimina la infección, y los parásitos persisten durante décadas en los tejidos del hospedero, a menudo como infecciones asintomáticas. Esto implica que el parásito es capaz de evadir el sistema inmune logrando persistir. A pesar de muchos años de investigación, aún no están claros los mecanismos de patogénesis de *T. cruzi* que expliquen por qué algunos pacientes permanecen toda la vida asintomáticos y otros progresan y desarrollan la enfermedad de Chagas. El daño tisular es una consecuencia directa de la presencia del parásito, induciendo daño e inflamación crónica, además existe una respuesta autoinmune desencadenada por moléculas similares entre *T. cruzi* y proteínas del hospedero que podría estar vinculada con la patogénesis de la enfermedad. Ambas respuestas no son mutuamente excluyentes [97, 98]. Independientemente de los mecanismos involucrados en la patogénesis, la respuesta inmune innata y adaptativa y su interacción con el parásito juegan un rol fundamental [99].

Respecto a la respuesta inmune innata, los microorganismos presentan estructuras altamente conservadas, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs. Entre ellos se encuentran lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, y distintos tipos de proteínas. Estos son reconocidos por diferentes receptores asociados a patógenos (PPR). Los receptores de tipo Toll (*TLR-Toll like receptors*), son un tipo de PPR, que juegan un rol importante en la respuesta innata de *T. cruzi* [100]. En humanos hay definidos 10 tipos de TLRs [101]. Los TLRs, además pueden ser activados por componentes endógenos liberados a causa de tejido dañado o inflamado [102] [103], los llamados patrones moleculares asociados a daño, DAMPs [104]. Los TLRs muestran una expresión diversa en una variedad de células y tejidos, así como diferente localización subcelular (ya sea en la superficie celular o dentro de los compartimentos endosomales). Existe un grado de redundancia entre las señales inducidas por varios

TLR, aunque también se han identificado vías de señalización específicas para alguno de ellos. Para generar una respuesta, transmiten su señal a través de diferentes moléculas adaptadoras, entre ellas MyD88 o TRIF [105, 106]. La activación de distintos TLRs lleva a la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria ya sea a través de NFκB (como el factor de necrosis tumoral alfa -TNF- $\alpha$ , IL12) o de IRF3/7 (como interferones alfa y beta - IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ) en macrófagos y células dendríticas **(Figura6).** 



**Figura 6. Diferentes PAMPs de** *T. cruzi* **son reconocidos por distintos TLRs activando respuestas inflamatorias.** Tomado de [100]. El reconocimiento de diferentes moléculas de *T. cruzi*, como los glicoconjugados de la superficie del parásito y los ácidos nucleicos, se produce a través de distintos receptores tipo Toll, que se localizan en la membrana plasmática o las membranas endoplásmicas, y se expresan de manera diferencial en varios tipos de células del sistema inmune innato. Los anclajes GPI de glucoproteínas similares a mucinas activan el heterodímero TLR2 / TLR6, GIPL es un agonista para TLR4, el ADN genómico activa el TLR9 y TLR7 está involucrado en el reconocimiento del ARN del parásito. Los TLR inducen la activación de NF-κB y/o IRFs a través de su interacción con diferentes moléculas adaptadoras que contienen dominios TIR. De estos, MyD88 y Mal / TIRAP son necesarios para la activación de NF-κB vía TLR2 y TLR4. De manera independiente de MyD88, TRIF y TRAM señalizan a través de TLR4, activando IRF3. TLR7 y TLR9

activan NF- $\kappa$ B e IRF7 a través de MyD88. La activación de NF- $\kappa$ B conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-12, mientras que se requieren IRFs para la transcripción de IFN tipo I.

Tanto NF-κB como IRF3 y 7 (pertenecientes a la familia de factores de regulación de interferón), juegan un papel clave en la regulación de la respuesta inmune debida a infecciones, generando respuestas inflamatorias [107-109]. También ambos son reguladores claves en la activación clásica de macrófagos (M1) [110, 111], caracterizados por aumentar la producción de citoquinas inflamatorias, así como tener actividad antimicrobiana. Estos macrófagos (M1) pueden ser activados mediante TLR4 capaz de activar PI3K a través de la proteína adaptadora BCAP [112], con la subsiguiente activación de la vía AKT/mTORC1 [113]. Se ha mostrado que la resistencia del hospedero a la infección por T. cruzi depende de la producción de IL12 y TNF mediada por MyD88 y de IFN-β mediada por TRIF en células dendríticas y macrófagos [114]. TRIF es activado únicamente por los TLR3 y 4. 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 [115], y las de los GIPL como agonistas del TLR4 mediando la inducción de NF-KB y mediadores inflamatorios [116, 117]. También se reportó que el ADN de T. cruzi tiene la capacidad de inducir señalización por TLR9 [118] [119, 120] y el ARN por TLR7 [121]. Se ha demostrado que la inducción de IFN, IL12 y otras citoquinas proinflamatorias mediada por TLRs 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 la infección por *T. cruzi* (mayor parasitemia y mortalidad) [122].

#### Terapias dirigidas al hospedero

Si bien los abordajes clínicos para enfermedades infecciosas tienen como foco el uso de medicamentos que permitan la eliminación del agente infeccioso, en los últimos años dado el incremento en el conocimiento sobre las interacciones hospedero-patógeno, el abordaje también se ha volcado a la identificación y desarrollo de terapias dirigidas al hospedero. Este tipo de estrategias terapéuticas son actualmente terapias complementarias viables y exitosas utilizadas en distintas infecciones bacterianas, virales y parasitarias [123]. Como ejemplos de este tipo de tratamientos en parásitos, en el caso de Plasmodium falciparum, causante de la malaria, una enzima relacionada al metabolismo del hierro (ferroquelatasa) del hospedero parece ser importante para la sobrevida del parásito, y el uso de un fármaco para inhibir dicha enzima (desferrioxamina) está siendo considerada para su uso en malaria [124]. También en casos de malaria severa, el uso de anticuerpos anti-TNF-α disminuyó la carga parasitaria de manera dependiente de la dosis y tuvo notables efectos antipiréticos [125]. En el caso de la tripanosomiasis africana causada por Trypanosoma brucei, se ha visto, utilizando ratones como modelo de infección, que un equilibrio entre la respuesta temprana TH1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) y tardía TH2 (IL4, IL10) es capaz de controlar la parasitemia [126]. En el caso de enfermedades causadas por Leishmania (cutánea, mucocutánea o visceral) se ha probado el uso de los fármacos Imiguimod y resiguimod, ambos capaces de generar una respuesta inmune innata por medio de un receptor Toll-like, induciendo la producción de IL6 e interferones tipo 1 así como TNFα, y, por lo tanto, actuando también a través del hospedero [127]. Otro ejemplo es el caso de infecciones causadas por Leishmania tropica, en las cuales se observó que la droga rapamicina, capaz de inhibir mTORC1 es capaz de controlar la carga parasitaria en ratones infectados con este parásito [128].

Por otro lado, en lo que respecta a fármacos relacionadas específicamente con la respiración mitocondrial, están como ejemplos la metformina, usada ampliamente en el tratamiento de la diabetes tipo 2. La misma es capaz de interrumpir la cadena respiratoria mitocondrial e inducir la producción de ROS. El uso de esta droga en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* permite incrementar la muerte de esta bacteria vía la producción de ROS, mejorar el control de la carga bacteriana, reducir la patología pulmonar en ratones e incrementar la respuesta inmune contra la bacteria [129].

25

Dado que en la enfermedad de Chagas se han encontrado cambios en el metabolismo energético, mostramos en la **Tabla 1** fármacos, muchos de ellos ya aprobadas por la FDA, capaces de modular directa o indirectamente el metabolismo energético, que analizamos en este trabajo de tesis. Algunos de estos fármacos actúan también directa o indirectamente sobre el metabolismo energético de microorganismos infecciosos (Atovaquone):

Fármaco	Función clásica	Función asociada a metabolismo energético	Antecedentes de uso en <i>T. cruzi</i>
Rapamicina	El fármaco Sirolimus se utiliza en pacientes que van a ser transplantados para evitar el rechazo del órgano [130]. Se ha investigado su uso para el tratamiento de algunos tipos de cáncer [131].	Inhibe mTORC1	En modelos de infección <i>in vitro</i> en macrófagos su uso ayuda a controlar la replicación de <i>T. cruzi</i> [79].
Metformina	Reduce niveles de glucosa en sangre mediante diversos mecanismos.	Inhibe complejo I de la respiración [132]	Mayor sobrevida en ratones infectados tratados con metformina [133].
Imatinib	Inhibidor específico de la tirosina quinasa Bcr-Abl. Tratamiento de la leucemia mieloide crónica.	Inhibe la glucólisis [134].	Se mostró una actividad moderada contra diferentes cepas y formas del parásito [135].
Galloflavin	No tiene actualmente usos clínicos.	Inhibe las enzimas lactato deshidrogenas A y B (LDHA y LDHB) [136].	Nosotros encontramos aumento de expresión de LDHB en cardiomiocitos infectados.
Atovaquone	Tratamiento de Malaria [137]	Inhibe el complejo III de la respiración en <i>P.falciparum</i> . Estructuralmente es similar a la ubiquinona mitocondrial interna (coenzima Q), componente del complejo III.[137].	
Visnagin	No tiene actualmente usos clínicos.	Inhibe la enzima Malato deshidrogenasa 2 (mitocondrial) [138].	Nosotros encontramos aumento de expresión de MDH2 en cardiomiocitos infectados.
Aicar	Anteriormente se usó para tratamiento y protección contra la lesión isquémica cardíaca.	<ul> <li>-Activa la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), la cual está relacionada con el metabolismo energético 139].</li> <li>-Regula el metabolismo de los lípidos y de la glucosa [139].</li> <li>-Otros: Regula la producción de citoquinas inflamatorias, la proliferación celular y la apoptosis [139].</li> </ul>	En infecciones virales y bacterianas su activación puede ser favorable o perjudicial dependiendo del microorganismo [140]. No hay antecedentes de uso en <i>T.</i> <i>cruzi.</i>
Cúrcuma	Se utiliza como condimento en las comidas. Tiene propiedades antiinflamatorias.	Es capaz de inhibir la glucólisis y/o la fosforilación oxidativa, e inhibir la señalización vía PTEN/AKT en células cancerígenas [134].	Utilizando ratones como modelo de infección, se encontraron efectos protectores [141].

Tabla 1. Selección de fármacos involucrados en el metabolismo energético.

### Interacción T. cruzi – célula hospedera

*T. cruzi* es capaz de infectar casi cualquier tipo de célula nucleada. Para lograr la infección *T. cruzi*, en primer lugar, debe poder adherirse a la célula hospedera. Estas primeras interacciones dependen de la cepa, del estadio del parásito, y del tipo celular infectado, generándose diversas y muy complejas transducciones de señales en la célula hospedera. Distintas moléculas de superficie del parásito pueden interaccionar con diversos receptores de las células hospederas, así como también factores secretados por ambos tipos celulares están involucradas en el proceso de infección y transducción de señales [142] [143]. La **Figura 7** 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 [142]. Dependiendo de las interacciones moleculares específicas que se lleven a cabo entre *T. cruzi* y la célula hospedera será el tipo de respuesta obtenida. Está gran versatilidad del parásito se relaciona con la gran cantidad de proteínas de superficie que es capaz de expresar. Muchas de ellas pertenecen a grandes familias multigénicas.



Figura 7: Modelo esquemático que resume las moléculas involucradas en el proceso de interacción entre un tripomastigota de *T. cruzi* y una célula hospedera. Extraído de [142].

#### Familias multigénicas del parásito.

Aproximadamente el 50% del genoma de T. cruzi está formado por secuencias repetitivas, muchas de ellas debidas a la presencia de familias multigénicas y retrotransposones [3]. 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 cruzipaína y oligopeptidasa B son las más relevantes [144]. Las transialidasas (TS) constituyen una superfamilia multigénica que se encuentra presente en kinetoplástidos como Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei y Trypanosoma rangeli, representada en T. cruzi por más de 1400 parálogos [145]. Estas enzimas transfieren residuos de ácido siálico desde glicoconjugados del hospedero hacia las mucinas del parásito [146]. Esto es importante ya que el ácido siálico no puede ser sintetizado por el parásito y la presencia de este residuo es de utilidad para distintos aspectos de la infectividad parasitaria [147] [148]. Las TS de tripomastigotas se encuentran ancladas a la superficie por una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) [147]. 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 [149]. Las transialidasas también pueden ser secretadas por el parásito y se ha demostrado que las TS son capaces de aumentar la sobrevida 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 [73, 150, 151].

Las mucinas de *T. cruzi* (TcMUC) están codificadas por una gran familia multigénica formada por cerca de 500 parálogos [3]. 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 [152]. Son proteínas altamente glicosiladas que 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 [153].

INTRODUCCIÓN

Las MASP, del inglés "*Mucin Associated Surface Proteins*" constituyen una familia multigénica formada por más de 1200 parálogos [154]. 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. 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 [155, 156].

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 [157] y, como ejemplo de modulación negativa, la glicoproteína gp90 [158, 159].

#### 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 [78, 160]. En uno de estos trabajos se identificaron 14 genes necesarios para la infección, algunos de ellos podrían funcionar como receptores para la entrada del parásito (CABP2, CDH11, LOC401993, PCDHA13 y PRIMA1) y otros podrían estar relacionados con la liberación de calcio desencadenada por *T. cruzi* durante la invasión celular (CABP2, CDH11, LOC401993, PCDHA13) [161]. Además, dos de ellos (FUT8 y CDH11) podrían relacionarse con la señalización mediada por TGF-β, cuya inhibición se ha visto disminuye los niveles de infección [162, 163]. 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 con la oxidación de ácidos grasos fueron identificados como necesarios para sustentar la replicación de los amastigotas intracelulares [78]. También se demostró que el metabolismo de purinas, pirimidinas, pteridinas así como

la actividad de la vía AKT son fundamentales para el ciclo infectivo del parásito [78]. Es importante resaltar que en ninguno de estos ensayos 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 oxidado [164-168]. En base a toda esta información queda de manifiesto que el proceso de infección por *T cruzi* es muy complejo, involucra distintas moléculas y vías de transducción de señales en la célula hospedera. Quizás es por esta complejidad que las diferencias experimentales (tipo celular, cepa del parásito, condiciones de infección, entre otras) podrían llevar a grandes diferencias en los resultados obtenidos.

#### Mecanismos de Invasión

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 [142, 169, 170]. Uno de los mecanismos de entrada es la fagocitosis /macropinocitosis que ocurre en células fagocíticas profesionales y es dependiente de los filamentos de actina [171]. 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 u otra alteración de la membrana plasmática de la célula hospedera. Por último, los tripomastigotas también pueden entrar en células no fagocíticas a través de las invaginaciones de la membrana plasmática que acumulan PIP3, el producto principal de la activación de PI3K [74] [172]. Los mecanismos de invasión también pueden depender de la forma del parásito, por ejemplo, recientemente se ha visto que amastigotas extracelulares de T. cruzi desencadenan selectivamente las vías PI3K / AKT y ERK durante la invasión de células HeLa [173]. Independientemente del mecanismo de entrada, se aumentan los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular de la célula infectada y los parásitos se encuentran durante las primeras horas rodeados de una vacuola parasitófora que se fusiona con endosomas y lisosomas tempranos [74]. El parásito permanece en la vacuola aproximadamente entre 2-8 horas luego de la infección y escapa de la misma entre las 8-15 horas aproximadamente [174]. La salida de la vacuola es facilitada por el bajo pH de la misma dado por los lisosomas [175]. En la Figura 8 se muestra un esquema de las diferentes vías de ingreso de los parásitos.



**Figura 8: Modelo de invasión de tres mecanismos por** *T. cruzi***.** Extraído de [176]. El modelo indica tres mecanismos distintos de entrada de *T. cruzi* en la célula hospedera. (a) la vía dependiente del lisosoma iniciada mediante una exocitosis regulada por Ca<sup>2+</sup> de los lisosomas en la membrana plasmática; (b) en la vía dependiente de actina, los tripomastigotas penetran en una célula hospedera a través de una expansión de la membrana plasmática que culmina en el ensamblaje de una vacuola parasitófora. Tanto los endosomas como los lisosomas pueden fusionarse con la vacuola parasitófora; (c) en la vía independiente del lisosoma, los parásitos ingresan a las células a través de las invaginaciones de la membrana plasmática que acumulan PIP3 (producto de la activación de la clase I PI3K). Posteriormente, los parásitos internalizados están contenidos en las vacuolas formadas a partir de la membrana plasmática y maduran adquiriendo marcadores endosómicos tempranos y posteriormente marcadores lisosómicos. Más tarde, la forma tripomastigota se transforma gradualmente en amastigota generando simultáneamente la lisis de la membrana de la vacuola parasitófora. Luego, los amastigotas en contacto directo con el citoplasma comienzan a dividirse.

### Respuesta transcripcional de células infectadas con T. cruzi

Diferentes estudios transcriptómicos utilizando tecnologías de microarreglos o secuenciación masiva, en distintos tipos de células infectadas han permitido comenzar a evaluar las características particulares y comunes de las respuestas a la infección [55-58, 62, 63, 67, 78, 177-184] **Tabla 2**. Muchos de estos trabajos utilizan distintas metodologías (experimentos de microarreglos o de secuenciación masiva), diferentes cepas de *T. cruzi*, distintos protocolos de infección y distintos tiempos post infección,

entre otros. Todas estas variables hacen que sea difícil la comparación entre los distintos trabajos, y no tener en cuenta las mismas, puede llevar a sacar conclusiones incorrectas. En nuestro grupo hemos llevado a cabo experimentos de infección con la misma cepa (Dm28c) en cardiomiocitos humanos ([185] y **Anexo1**), células epiteliales HeLa ([179]) y macrófagos THP1 (trabajo no publicado aún), utilizando la misma tecnología (microarreglos de Agilent), protocolos y tiempos similares de infección. Esto nos permite comparar las respuestas minimizando variables, y por lo tanto nos avala a extraer información confiable de vías comunes y específicas de cada tipo celular. Esta información puede ayudar a comprender mejor la patología de la enfermedad de Chagas.

Сера	DTU	Modelo de	Modelo de infección	Relación	Tiempo de	Tiempos	Metodología	Referencia
utilizada		propagación		parásito/	interacción y	analizados	utilizada	año
				célula	cantidad de			, uno
					lavados			
Sylvio	TC I	C2C12 (línea	Ratones machos C3H	1 millón	NA (No	3, 37 y 110	Atlas mouse 1.2 II Microarreglos	[58], 2003
X10/4		celular de	/HeN de 6-8 semanas	de 	aplica)	dias post	Clontech	
		musculo		tripomas				
		esqueletico		tigotas		(dpi)		
		murino)						
ND	ND	NA	Tejidos de corazón de	NA	NA	NA	Microarreglos	[63], 2005
			pacientes con CCC o				Affymetrix	
			DCM					
Brasil	TCI	ND	5-7 ratones machos	5×10 <sup>4</sup>	NA	30, 60, 90,	Microarreglos de	[181], 2008
Y	тси		CD-1. Cultivo de	tripomas		120, 150, 180	cDNA del Albert	
Ŷ	TCII		cardiomiocitos de	tigotas		dpi	Medicine	
			ratones					
Tulahuen	TC II	ND	HeLa	10:1	0	3 dpi	Microarreglos	[57], 2008
	7.011						Affymetrix	[404] 0000
Ŷ	ICII	LcMK2 ( <i>M</i> .	Fibroblastos, células	1	2 hs	24h horas	Microarregios Affymetrix.	[184], 2009
		mulatta).	endotellales y celulas	×10°/mi	5 lavados PBS	post		
			del musculo liso	parasitos		interaccion		
						(npi)		
Brasil	TCI	Mioblastos	Cardiomiocitos de	5:1.	24hs,	48hpi	Microarreglos de	[56], 2009
		de rata L6E9.	ratones neonatos		ND lavados		cDNA del Albert Einstein College of	
							Medicine	
Brasil	TCI,	Mioblastos	Mioblastos de rata	1:1	48hs,	72hpi	Microarreglo de	[180], 2010
Y	TCII	de rata L6E9.	L6E9.		2 lavados		Universidad de	
CLDr							Duke.	
CLDI,	101							
Tulahuen	TC II							
Dm28c	TCI	Células Vero.	Cardiomiocitos	10:1.	6hs, 1 lavado	1, 2, 4, 6, 12,	Microarreglos	[55], 2011
			primarios de ratón		con Ringer.	24, y 48 hpi.	Affymetrix.	
			obtenidos de					
			embriones de 18 días.					

Thaluen	TC II	LcMK2	HeLa	5:1	2hs, 2 lavados	18 y 72 hpi	Genome wide	[78], 2013
					PBS		RNAi.	
Dm82c	TCI	Células Vero.	HeLa	10:1.	4hs, 2 lavados	0, 3, 6 hpi	Microarreglos	[179], 2014
					PBS.		Agilent.	
Tulahuen	TCII	Células de	Cardiomiocitos	10:1.	0	15, 30, 60, 90	Microarreglos	[62], 2016
		mioblastos de	humanos primarios			and 120 min.	Affymetrix	
		corazón.	(PromoCell)			1 lavado.		
Y	TCII	LLcMK2	Fibroblastos humanos	ND	2hs, 5 lavados	4,6,12,24,48	Illumina Hiseq	[178], 2016
					con PBS	y 72hpi	1500 PE 101pb	
Sylvio	TCI	Células Vero.	Fibroblastos humanos	10:1	2hs, 5 lavados	4, 12, 20, 24,	Illumina HiSeq	[177], 2016
v	тсш				PBS	30, 48, 72 and	1500 PE 100pb	
	TCII					96 hpi		
CL Brener	TCVI	LLCMK2	Fibroblastos humanos	80:1	2hs, 3-5	60 -96hpi	Illumina HiSeq	[183], 2017
CL14	тсуі				lavados PBS		1500 PE 100pb	
	1011							
Y	TCII	Células Vero.	Explantos de placenta	10 <sup>5</sup> o 10 <sup>6</sup>	0	2 o 24 hpi	Microarreglos	[182], 2018
			humanas	parásitos		Se lava, pero	Agilent	
				/ml.		no especifica		
						cantidad.		
ND	ND	NA	Muestras de pacientes	NA	NA	NA	Microarreglos	[67], 2018
			con CCC, DCM.				Agilent	

Tabla 2. Resumen de artículos de estudios transcriptómicos en diferentes modelos de infección de T. cruzi.(ND: No hay datos, NA: No Aplica)

## **OBJETIVOS**

•

## **OBJETIVOS**

### GENERAL

Estudiar la interacción *T. cruzi* – cardiomiocitos humanos a tiempos cortos de infección y compararla con la infección en macrófagos y células epiteliales humanas.

## **ESPECÍFICOS**

- 1. Llevar a cabo estudios de expresión génica diferencial entre cardiomiocitos primarios humanos infectados con *T. cruzi* versus cardiomiocitos no infectados, a tiempos cortos de infección.
- 2. Analizar funcionalmente aquellas vías biológicas alteradas en respuesta a la infección por *T. cruzi*.
- 3. Estudiar el efecto de distintos fármacos relacionados con el metabolismo energético, en la infección/replicación del parásito.
- 4. Comparar la respuesta a la infección con *T. cruzi* en las siguientes células humanas: cardiomiocitos primarios, células epiteliales y macrófagos.
# MATERIALES Y MÉTODOS

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Cultivos celulares**

Todas las células fueron cultivadas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Los cardiomiocitos humanos primarios (Celprogen - 36044-15) fueron cultivado en el medio de cultivo para Cardiomiocitos humanos primarios (Celprogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado durante 40 minutos a 56°C.

Las células endoteliales primaria de vena umbilical humana -Huvec- (ATCC) fueron cultivadas en un medio Vascular Basal (ATCC) suplementado con el Kit de crecimiento BBE- para células endoteliales (ATCC).

La línea celular de monocitos leucémicos humanos (THP1) se cultivó en medio RPMI1640 (Gibco) suplementado con 0.05mM de 2 mercaptoetanol y 10% de SBF. La diferenciación de los monocitos a macrófagos se hizo a partir de 1 x 10<sup>6</sup> células en placa de 6 pocillos con 160nM de Phorbol 12-mistrato 13-acetato (PMA) (Sigma) durante 24hs. Luego se lavaron las células y se agregó medio sin PMA por otras 24hs para luego llevar a cabo los experimentos de infección.

## Cultivo de parásitos

La cepa de *T. cruzi* utilizada en este trabajo fue Dm28c del linaje Tcl [186]. La obtención de tripomastigotas se hizo a partir de la infección de células Vero. Luego de 5-6 días, el sobrenadante de cultivo conteniendo tripomastigotas se centrifugó a 1500 *g* durante 10min y se lavó una vez con PBS, para ser utilizado en los ensayos de infección (protocolo P3 en base a Anexo 2). Para los ensayos de infección, cardiomiocitos semiconfluentes fueron infectados en una relación 10:1 tripomastigota:células, centrifugados 1 minuto a 250g e incubados durante 2 hs (período de interacción) para permitir la invasión del parásito a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en el medio de cardiomiocitos sin suero. Luego del período de interacción, los parásitos fueron removidos, y las células lavadas 3 veces con PBS, e incubadas en el medio de cardiomiocitos conteniendo 10% suero. Las muestras (células infectadas y controles) fueron tomadas 0, 3, 6 y 12 horas post interacción (hpi), llamados  $t_0, t_3, t_6 y t_{12}$  respectivamente. Para algunos casos también se tomaron muestras 24 y 48

hpi. En el caso de las células THP1, las muestras fueron tomadas 0, 3, 6, 12 y 24 horas post interacción (hpi).

#### Extracción de ARN y Microarreglos

El ARN total de las distintas muestras fue purificado utilizando el kit Direct-zol RNA MiniPrep Kit (Zymo) como indica el fabricante. En todos los casos se trató con DNAsa libre de RNAsas con el fin de remover ADN contaminante. El ARN total fue cuantificado utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), y su calidad fue determinada mediante el Agilent 2100 Bioanalyzer, y las muestras con un RIN (RNA Integrity Number) mayor a 7 fueron utilizadas. Los experimentos de Microarreglos se realizaron utilizando los Arreglos de Agilent: "Human Gene Expression 4x44k" (Agilent) marcando con un color. Se utilizaron 200ng de ARN total, y los mismo fueron retrotranscriptos a ADNc, y luego transcriptos a ARNc y marcados utilizando el kit de Agilent: "Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-color". El ARN marcado fue purificado con el kit: "Illustra RNAspin Mini Isolation kit (GE Healthcare). La cantidad total y la especificidad del ARNc obtenido fue verificada utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Luego se procedió a la hibridación, y lavado de las muestras según las especificaciones del protocolo del kit de Agilent. Los microarreglos fueron escaneados utilizando el scanner de Agilent modelo G2565BA, y adquiridos a través del programa de Agilent Feature Extraction (versión 9.5.1). Para el caso de los cardiomiocitos se hicieron tres réplicas biológicas para el tiempo t<sub>0</sub> y t<sub>3</sub>, y dos para los tiempos t<sub>6</sub> y  $t_{12}$ . Para el caso de los microarreglos de THP1 se hicieron tres réplicas biológicas para las muestras tomadas a  $t_0$ ,  $t_3$ ,  $t_6$ ,  $t_{12}$  y  $t_{24}$ , luego del período de interacción.

#### Análisis informático

#### Microarreglos de Cardiomiocitos y macrófagos y análisis de vías biológicas alteradas

El procesamiento de los datos de microarreglos se hizo utilizando el programa GeneSpring GX de Agilent (versión 12.0). Los genes significativamente sobre y sub expresados fueron identificados utilizando el test ANOVA con un *p*-value  $\leq$ 0.01 para cardiomiocitos y un un *p*-value  $\leq$ 0.001 para THP1, aplicando la corrección de test múltiple de Benjamini-Hochberg. Se consideraron aquellos genes con un cambio de expresión de al menos dos veces respecto al control para al menos un tiempo (FC  $\ge$  2). Para todos los casos se consideraron vías biológicas significativas aquellas con un valor de FDR (*False Discovery Rate*)  $\le$ 0.05.

La comparación de distintas vías biológicas entre experimentos de infección de cardiomiocitos, HeLa y THP1 se llevó a cabo con el software libre Funrich (<u>http://www.funrich.org/</u>) [187]. Se tomaron para cada caso los resultados obtenidos para los tiempos *t0, t3, y t6*. Definimos para cada tipo celular genes sobreexpresados o subexpresados como aquellos que cambian su expresión en al menos dos veces para al menos dos tiempos de los tres analizados.

#### Análisis de cluster entre células HeLa, macrófagos y cardiomiocitos

Los resultados obtenidos luego de analizar las imágenes de los microarreglos de HeLa, THP1 y cardiomiocitos con el programa *Feature Extraction* (Agilent) de muestras infectadas y controles a *t0*, fueron procesados utilizando el paquete lima del entorno R. Se llevó a cabo la corrección del *background* con el método "*normexp*" de lima (offset=1) y la normalización entre microarreglos fue llevada a cabo por el método de los cuantiles. Finalmente, dentro de cada microarreglo los valores replicados para cada sonda fueron reemplazados por el valor promedio del logaritmo en base 2 de los valores. El análisis de clusters, se realizó sobre la matriz de expresión de los genes anteriormente identificados como diferencialmente expresados en al menos un tipo celular (5972 genes). El análisis fue basado en las distancias euclidianas y el método de unión completo (funciones *dist* y *hclust* del entorno R). El dendrograma fue construido en base al promedio de expresión por tipo celular y condición (infectado versus control) y la topología reproduce el dendrograma que se obtiene sin este colapsamiento de las muestras.

#### Obtención de datos para el diagrama de Venn de muestras controles

Luego de llevar a cabo la normalización de los datos de microrarreglos como fue explicado anteriormente, para los controles no infectados en cada tipo celular a t0, se identificaron los genes con un valor de expresión promedio mayor a 7.4, correspondiendo este límite al primer valor del primer cuartil de la distribución de los valores de expresión en cada muestra.

### Transcripción reversa y PCR cuantitativa (qRTPCR)

A partir de 500ng de ARN total se sintetizó ADNc utilizando la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) con Oligo(dT). Los oligos utilizados durante esta tesis se muestran en la Tabla 3. La mayoría de estos oligos fueron diseñados en dos exones diferentes para evitar amplificación del ADN. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen total de 10uL utilizando el kit de SybrGreen (KAPA SYBR FAST Universal 2X qRTPCR Master Mix, KapaBiosystems), una concentración de los oligos forward y reverse de 200nM, y 1uL de una dilución 1/5 del ADNc. Cada reacción se hizo por duplicado en el equipo Eco Real-Time PCR System (Illumina). Las condiciones estándar de amplificación fueron: 3 min a 95°C y 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 58°C, y 30 s a 72°C. Luego de la reacción de PCR, se analizaron las curvas de disociación para comprobar la amplificación de un solo producto. También para algunos genes (LDHB, MDH2, RPS10, y PGC-1 $\alpha$ ) se realizaron geles de agarosa y secuenciación de los productos de PCR, con el fin de comprobar el tamaño y la secuencia esperada. Los valores de Ct para cada gen fueron normalizados en base al gen GAPDH, calculando el ΔCt para cada gen en todas las muestras (2-3 réplicas de los controles y muestras infectadas para los distintos tiempos post infección). El método delta-delta Ct fue utilizado para determinar la expresión relativa de cada gen en la infección respecto al control [189].

Para determinar la relación de ADN mitocondrial (ADNmt) respecto al nuclear, el ADN total de las muestras infectadas y controles fue extraído con el kit DNAzol kit (Invitrogen). La relación de ADNmt respecto al nuclear se determinaron por PCR en tiempo real utilizando oligos específicos para el fragmento 7122-7285 del genoma mitocondrial RN39 (Secuencia ID: MF681706.1) y oligos para el gen nuclear  $\beta$  –actina, utilizando el método delta-delta Ct. Los resultados se expresan relativos al control (sin infección).

Gen	Forward	Reverse
LDHB	GTCTTCTCCGCACGACTGTT	CAGCCAGAGACTTTCCCAGAA
MDH2	ATGATATCGCGCACACACCC	GGGATGGTGGAATTAACCGGA
NDUFB4	GCCATAAGAGCCCAGCTGAA	TCTTTCCTATCCCTCTCAGTTTTGA

ANXA1	GCAAGAAGGTAGAGATAAAGACACT	TGACGCTGTGCATTGTTTCG		
EIF3H	CTTGGAAAGATGGCGTCCCG	AATACCACAAGGCCATCTATCTGC		
	TGTATACCGCAGATTCAGGC	AAACCAGAACATTTATTGCATGAC		
RPL37 RPS10	CGAGACTCACAAGAGGGGAA	ACTGGAATTCGGTTGCTGAC		
PGC-1α	GACCCTCCTCACACCAAACCCACA	GGGGTCATTTGGTGACTCTGGGGTC		
HLA-C	ATCGTTGCTGGCCTGGCTGTCCT	TCATCAGAGCCCTGGGCACTGTT		
GAPDH	TCGGAGTCAACGGATTTG	CCTGGAAGATGGTGATGG		
<b>mt</b> 7121-7284	CAAACCTACGCCAAAATCCA	GAAATGAATGAGCCTACAGA		
eta-actin	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG		
	CACCGGAAGGAACCATCTCA	TGGCAAAACTGCACCTTCACA		
IL8 SOD2	CACTGGAAGGAACAACAGGC	GGGATCATTAGGTGATCAGCA		
CXCL2	ACGGCAGGGAAATGTATGTGT	TCGAAACCTCTCTGCTCTAACA		
IL6	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC	TACATGTCTCCTTTCTCAGGGC		
TNF-α	ACTTTGGAGTGATCGGCC	GCTTGAGGGTTTGCTACAAC		
ΝΓκΒ	TGCACTTGGCCATCATCCAT	TCTCGGAGCTCAGGATCACA		
PTX3	TTGCGATTCTGTTTTGTGCT	GTGGGGTCCTCAGTGGG		
OLR1	TTACTCTCCATGGTGGTGCC	AGCTTCTTCTGCTTGTTGCC		
rLDL	CTCCCGCCAAGATCAAGAAA	GTTTGGAGTCAACCCAGTAGAG		
HMGCS1	GAAAGGGAGTGAGCCACG	GGTGGGTTGGCGGCTATA		

Tabla 3. Secuencia de los oligonucléotidos utilizados.

### Estudio de proliferación celular

La proliferación de los cardiomiocitos infectados respecto a sus controles se llevó a cabo utilizando la sonda fluorescente CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Thermo), mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, una vez crecidas las células, se tripsinizaron, se centrifugaron, y luego se lavaron y resuspendieron a una concentración de 1x 10<sup>6</sup> cel/ml. Se marcaron con 5µM CFSE en PBS a 37°C 15 minutos. Luego las células se lavaron en PBS/suero 10%, más otros dos lavados con PBS sin suero. 1x10<sup>5</sup> células fueron plaqueadas de placa de 6 pocillos. 24 horas después se llevaron a cabo las infecciones, con sus respectivos controles. Se dejaron 2 horas interaccionar las células y los parásitos (t0), se lavaron con PBS y se agregó nuevo medio con SBF 10%. A las 0, 24, 48, y 72hpi, se tripsinizaron, lavaron con PBS, y fijaron las células durante 15 minutos con paraformaldheido al 4% en PBS. Luego se lavaron, y resuspendieron en PBS con 3% SBF, para medir la fluorescencia en el citómetro Accuri C6 (BD - Biosciences). El análisis se llevó a cabo con el Software C sampler de BD. Para los controles e infecciones se consideró 100% de replicación la condición C0 e I0 respectivamente.

#### Western blot y ensayos de inmunofluorescencia

Los anticuerpos policionales contra 4EBP1 (# 9452) y los anticuerpos monocionales contra mTORC1 (# 2983), fosfo-mTOR (# 5536), p70S6K (# 2708), fosfo-p70S6K (# 9234), fosfo-4EBP1 (# 9452), AKT ( # 4685), fosfo-AKT (# 2965) y fosfo-AKT (ser 473) (# 4060) ікВ-alpha (44D4) y fosfo- ікВ-alpha (S32/36)(5 A 5) fueron adquiridos de Cell Signaling Technology. El anticuerpo anti-GAPDH se adquirió de Sigma. Para llevar a cabo los estudios de Western blot se utilizaron 20 ug de extractos de proteína total de T. cruzi y se realizó una corrida electroforética con geles de poliacrilamida al 12% (SDSPAGE) en condiciones reductoras. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare), se llevó a cabo por transferencia húmeda. Las membranas se bloquearon utilizando leche en polvo no grasa al 5% en TBS durante 1 hora, o a 4 °C toda la noche (ON). Luego de lavar una vez con TBS-Tween 20 al 0,1% (TBST), se incubaron las membranas con una dilución 1/1000 de los anticuerpos en albúmina de suero bovino al 5% (BSA) (Sigma) en TBST ON a 4ºC. Luego se realizaron tres lavados de 5minutos cada uno con TBST para luego incubar con el anticuerpo secundario: anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa o anti-ratón (Sigma). La señal se reveló con el sustrato quimioluminiscente Super Signal West Pico (Thermo Scientific) y se registraron las imágenes. Para la inmunofluorescencia indirecta (IIF), las células se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 4% y luego se permeabilizaron y bloquearon con saponina al 0,5% / BSA al 4% en PBS. Los portaobjetos se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo anti-Cyt C generado en ratón (Abcam), utilizando una dilución 1: 100 en saponina al 0,5% / BSA al 4% en PBS. Después de 3 lavados con PBS-saponina al 0,5%, los portaobjetos se incubaron con IgG anti-ratón conjugada con ALEXA-488 (dilución 1: 1000, de Invitrogen)

y se lavaron 3 veces con PBS-saponina al 0,5%. Finalmente, los portaobjetos se montaron con *antifade Prolong* con DAPI (Invitrogen) y se visualizaron bajo un microscopio Olympus IX 81 acoplado a una cámara Orca-ER de Hamamatsu (Diagnostic Instruments).

### ELISA

Para la determinación de IL8 en sobrenadante de macrófagos infectados, se utilizó un ELISA "sandwich". Para ello, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pocillos con el anticuerpo de captura anti IL8 humano (BD Biosciences-US) a la dilución recomendada, en buffer carbonato 0,1 M pH 9 durante toda la noche a 4ºC. Luego de dos lavados con PBS-Tween 0,1 % (PBST), los pocillos fueron bloqueados con PBS-BSA 1% durante 1 h a 37ºC. 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 37ºC 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 37ºC. Luego de 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 37ºC y la reacción se detuvo con el agregado de HCl 3 M. La lectura se desarrolló en un lector de placas a 492 nm.

#### Medición del Perfil Bioenergético

Está metodología fue llevada a cabo en colaboración con la Dra. Lucía Piacenza del Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina.

Las tasas de consumo de oxígeno (QO<sub>2</sub>) y las tasas de producción de protones (PPR) se midieron utilizando el analizador de flujo XF24 *Seahorse (Seahorse Bioscience*). Para ello, se sembraron en una placa los cardiomiocitos (5 x 10<sup>4</sup> células / pocillo) y se incubaron a 37ºC en medio completo durante 24 h antes del experimento. Los medios de cultivo se cambiaron 1 h antes del ensayo a Medio Eagle Modified Dulbecco no amortiguado (DMEM, pH 7,4) suplementado con L-glutamina (2 mM; Gibco), glucosa (5 mM) y piruvato (1 mM). Luego se inyectaron secuencialmente oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa, complejo V), carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, agente desacoplante) y una mezcla de Antimicina A (AA, inhibidor del complejo III) y Rotenona (Rot, inhibidor complejo I) a concentraciones finales de 2.0, 1.0 y 1.0  $\mu$ M, respectivamente. Luego de restar la respiración no mitocondrial (consumo de oxígeno en presencia de AA-ROT) de cada dato, el QO<sub>2</sub> fue normalizado respecto al número de células e informado como pmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>4</sup> células. También se calcularon la respiración basal, la respiración máxima (QO $_2$  en presencia de FCCP), y la reserva respiratoria (QO $_2$ en presencia de FCCP - QO<sub>2</sub> basal) y la relación de control respiratorio (RCR, QO<sub>2</sub> con FCCP / QO2 con oligomicina). Se analizaron cinco réplicas por condición en cada ensayo de placa y se realizaron al menos tres experimentos independientes. Para analizar la función glucolítica, las células se cultivaron sin glucosa ni piruvato. Luego, se añadieron secuencialmente glucosa (10 mM), oligomicina (1 µM) y 2-desoxiglucosa (100 mM). La oligomicina detiene la síntesis de ATP mitocondrial y cambia la vía de producción de energía a la glucólisis, con el subsiguiente aumento en la PPR, revelando la capacidad glucolítica máxima celular. La 2-desoxi-glucosa, un análogo de la glucosa, inhibe la glucólisis al unirse a la hexoquinasa. Para evaluar la β-oxidación de los ácidos grasos endógenos, utilizamos el inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa 1, etomoxir (100 μM, Sigma), que evita la formación de acil-carnitinas, un paso necesario para el transporte de cadenas de ácidos grasos desde el citosol hasta la mitocondria. El QO<sub>2</sub> se midió antes y después de la adición de etomoxir en células infectadas y controles en medio DMEM. Los datos se analizaron mediante el software XGe-96 y el software GraphPad Prism (Figura 9).

45



Figura 9. Esquema de la medida de los principales parámetros de la respiración mitocondrial utilizando el analizador Seahorse: respiración basal, producción de ATP, fuga de protones, respiración máxima y capacidad de reserva respiratoria.

## Determinación de especies reactivas del oxígeno.

Los cardiomiocitos fueron incubados con *T. cruzi* y lavados con PBS 2 horas luego de la interacción con el fin de eliminar parásitos libres. Luego de 24 horas, las células (infecciones y controles) fueron nuevamente lavadas e incubadas durante 45 minutos a 37°C con 100µM de 2′7′-dicloro-dihidro-fluoresceina diacetato (DCFH-DA, Sigma); la oxidación de DCFH-DA por especies reactivas del oxígeno se analizó por citometría de flujo en el en el citómetro Accuri C6 (BD - Biosciences) a 529nm.

# Estudio del impacto de fármacos sobre la infección/replicación del parásito.

Los cardiomiocitos fueron tratados con diferentes concentraciones de distintos fármacos relacionados con el metabolismo energético durante 24h. Las concentraciones a utilizar se definieron en base a bibliografía presentada en la Tabla 1. Luego, las células

fueron lavadas e infectadas con una relación 10:1 parásitos-célula. Los parásitos utilizados expresan el gen LacZ, lo que permite observar la formación de betagalactosidasa utilizando el sustrato CPRG (Chlorophenol red-beta-Dgalactopyranoside) (Sigma) mediante el revelado del viraje de color a 595 nm, siendo ésta una medida indirecta de la cantidad de parásitos [190]. Luego de 2 horas de interacción, se lavaron las células con el fin de descartar parásitos no internalizados, se agregó medio de cultivo y luego de 24hs, se lavaron las células y se agregó el sustrato CPRG. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 595nm, utilizando el equipo ELx800 Universal Microplate Reader (BioTek Instruments). Las células control (sin fármaco), se consideraron como el 100% de replicación del parásito. La reducción de resazurina (Sigma) fue utilizada para evaluar la viabilidad de las células tratadas con alguno de los fármacos [191].

Los fármacos utilizados fueron los indicados en la Tabla1.

# Evaluación de la β-galactosidasa asociada a senescencia en solución

Las células infectadas y controles luego de 24, 48 y 72hpi, se lavaron y resuspendieron en buffer fosfato (pH 6.0). Luego se lisaron mediante ciclos de congelación / descongelación, y los lisados se centrifugaron a 12.000 g por 7 minutos. 50ul del sobrenadante se mezclaron con 150ul de CPRG (Sigma) (0.3 µg/µL) en buffer fosfato (pH 6.0) MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Los sobrenadantes se incuban a 37°C ON, y la absorbancia se midió a 595 nm en espectrofotómetro [192].

#### Medida de glucosa y lactato en sobrenadante de cultivo

La medida de lactato y piruvato en el sobrenadante se obtuvo a distintos tiempos por interacción, utilizando el equipo Bioprofile Basic 2 Analyzer (Nova biomedical).

## Determinación del porcentaje de infección /replicación

Cardiomiocitos primarios, macrófagos THP1 y células epiteliales HeLa se infectaron con tripomastigotas (1:10) durante 2 h. Las monocapas se lavaron con PBS para eliminar los parásitos extracelulares y se incubaron con medio fresco sin parásitos durante 72 h. Luego, las células se fijaron con paraformaldheído - PFA al 4% y se tiñeron con el

marcador de ADN, DAPI (*ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI*, Thermo Fisher). El porcentaje de infección se determinó contando la cantidad de células infectadas sobre el total de células, la media de amastigotas por célula se determinó haciendo un promedio de los amastigotas por célula infectada.

#### Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos entre dos grupos (con los datos de expresión de qRTPCR) fueron realizados utilizando el t-test de *Student* no pareado. Diferencias en los perfiles bioenergéticos y de porcentajes de infección y replicación en los tres tipos celulares, fueron calculados con el test de análisis de varianza de un factor (*one-way ANOVA*), y las diferencias particulares entre dos grupos fueron analizadas con el test post-hoc de Tukey. Un valor de *p* menor a 0.05 fue considerado significativo para todos los casos.

Los resultados relacionados con los objetivos 1 y 2 de esta tesis fueron publicados en la revista Frontiers in Microbiology, bajo el título: *"Early Trypanosoma cruzi infection triggers mTORC1-mediated respiration increase and mitocondrial biogenesis in human primary cardiomyocytes"* (Anexo I).

Los resultados relacionados con el objetivo 4 forman parte de un manuscrito en preparación.

Resultados relacionados a aspectos metodológicos de esta tesis se encuentran en una segunda etapa de revisión en la revista Journal of Proteomics, con el título: "*Host pathogen transcriptomics: Trypanosoma cruzi as a model for studying RNA contamination*" (Anexo 2).

#### Resultados relacionados con los Objetivos 1 y 2.

# Genes relacionados a las vías del metabolismo energético y síntesis de proteínas se sobre-expresan en cardiomiocitos infectados.

Con el objetivo de analizar la respuesta de cardiomiocitos humanos a la infección con *T. cruzi*, realizamos experimentos de microarreglos de Agilent de células infectadas y controles. Se tomaron muestras a las 0, 3, 6 y 12 hpi [174]. Durante ese período se produce la adhesión, entrada y egreso del parásito de la vacuola parasitófora, pero aún sin comenzar la replicación intracelular. Los genes que mostraron al menos dos veces cambio en su expresión en la infección respecto al control (Fold Change  $\geq$  2) y una probabilidad del 99% de ser diferencialmente expresados ( $p \leq 0.01$ ) fueron considerados en los análisis subsiguientes. Observamos más de 290 genes sobre-expresados por la infección a los tiempos estudiados, mientras que sólo 25 genes fueron sub-expresados (**Figura 10A**). El análisis de cluster de los genes muestra que los mismos se agrupan correctamente entre muestras infectadas y controles (**Figura 10B**). De los genes sobre-expresión

hasta las 12 hpi (Figura 10Ca), mientras que solamente 3 genes permanecieron subexpresados durante todos los tiempos analizados (Figura 10Cb).



**Figura 10.** Genes diferencialmente expresados en respuesta a la infección por *T. cruzi.* (A) Cantidad de genes diferencialmente expresados (Fc  $\ge 2$ ,  $p \le 0.01$ ) a los distintos tiempos post interacción (0, 3, 6 y 12hpi). (B) Análisis de agrupamiento jerárquico de genes diferencialmente expresados. (C) Diagrama de Venn comparando (a) genes sobre-expresados y (b) genes sub-expresados.

El análisis de las vías biológicas y de ontología de genes mostró que los cambios más significativos (p≤0.001) fueron aquellos relacionados con la síntesis de proteínas y el metabolismo energético. Particularmente, los genes relacionados a las vías de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa mitocondrial incrementaron en las células infectadas (Tabla 4 y Figura 11A). Con el fin de confirmar estos resultados se seleccionaron genes, y los cambios en su expresión fueron validados por qRTPCR (Figura 11B). Además, para alguno de los genes, (*mdh2, ldhb y ndufb4*) se llevó a cabo una cinética a las 0, 3, 6, 12 y 24hpi, encontrando que los mismos se encuentran sobre-expresados a todos los tiempos estudiados (Figura 11C). En conjunto estos resultados muestran que los cardiomiocitos responden a la infección con un rápido aumento de la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo mitocondrial, el cual se mantiene durante los tiempos analizados.

Gen	Complejo/Ubicación*	0h	3h	6h	12h
ATP5E	Complejo V	40.1	31.4	31.1	24.1
MT- ATP6	Complejo V	13.4	6.1	6.2	8.5
COX6c	Complejo IV	5.4	3.4	6.1	7.0
NDUFB4	Complejo I	9.2	3.2	4.8	7.7
NDUFB8	Complejo I	4.8	4.2	3.7	3.9
MT-CYTB	Complejo III	3.9	5.2	1.8	3.2
UQCRFS1	Complejo III	5.0	1.8	2.1	3.7
LDHB	Citosólica	11.7	13.0	7.5	4.0
MDH2	Mitocondrial	7.9	10.2	6.5	10.7

Tabla 4. Valores de expresión de genes relacionados con el metabolismo energético. Los valores representan el *Fold change* (Fc) de células infectadas vs los controles obtenidos con el análisis de los microarreglos de Agilent. ( $p \le 0.01$  y Fc $\ge 2$ )



В

С





53

**Figura 11.** Análisis de vías biológicas y qRTPCR. (A) *Heat map* de las vías biológicas más significativamente alteradas. C e I representan control e infección respectivamente. (B) Cuantificación de genes por qRTPCR. Las barras representan los cambios relativos de expresión de los genes (*rps10, rpl37, eif3h, ndufb4, ldhb, mdh2, anxa1, hla-c*) a *t0* en la infección respecto al control. Los valores son el promedio de tres réplicas biológicas ± SEM. \**p*≤0.05 determinado utilizando el t-test. La línea punteada representa el valor en el cual no hay diferencias en la expresión entre las células infectadas y los controles (1). (C) Análisis cinético de expresión entre 0-24 hpi respecto al control por qRTPCR de genes seleccionados. La línea punteada representa el valor en el cual no hay diferencias en la expresión entre las células infectadas y los controles (1). Los valores son el promedio de dos o tres réplicas biológicas ± SEM. \* *p* ≤0.05.

#### La respiración mitocondrial está elevada en cardiomiocitos infectados.

Con el fin de validar funcionalmente el incremento encontrado a nivel transcripcional de genes relacionados con el metabolismo energético en células infectadas, determinamos el consumo de oxígeno en células infectadas y sin infectar. Para ello los cardiomiocitos infectados y control fueron cultivados en DMEM en presencia de glucosa, piruvato y glutamina, y el consumo de oxígeno (QO<sub>2</sub>) fue determinado luego de la adición secuencial de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa, complejo V), FCCP (agente desacoplante) y una mezcla de antimicina A (AA, inhibidor del complejo III) y rotenona (Rot, inhibidor del complejo I). Como se indica en Materiales y Métodos, se determinó la respiración basal y la capacidad respiratoria máxima en diferentes condiciones. No se observaron diferencias significativas del QO<sub>2</sub>, entre células infectadas y control a las 6 hpi, mientras que a las 17hpi los cardiomiocitos infectados mostraron un aumento en la respiración basal y máxima, y, a las 24hs además aumenta significativamente la capacidad de reserva respiratoria (**Figura 12 A y B**).



**Figura 12. Bioenergética mitocondrial. (A)** Curvas obtenidas de consumo de oxígeno, QO<sub>2</sub>, en las muestras control (círculos negros) y en las infecciones (círculos blancos) a las 6 y 24hpi siguiendo el agregado de oligomicina (2µM), FCCP (1µM) y AA-ROT (1µM cada una). QO<sub>2</sub> se expresa como los pmol O<sub>2</sub> consumido/min/10<sup>5</sup> por los cardiomiocitos y son el promedio de tres determinaciones independientes. **(B)** Los parámetros bioenergéticos mitocondriales se calcularon luego de restar la respiración no mitocondrial (QO<sub>2</sub> luego de la adición de AA-RO) a todos los datos. La respiración basal (sin el agregado de fármacos), la respiración máxima (QO<sub>2</sub> luego del agregado de FCCP) y la reserva respiratoria (calculada como la diferencia entre la QO<sub>2FCCP</sub> y la QO<sub>2Basal</sub>) fueron analizadas a distintos tiempos post interacción (6, 17, y 24hpi). Cada valor representa el promedio ± SEM n=10. \*\* p≤0.01, \*\*\*p≤0.001.

En estudios previos realizados en nuestro grupo, analizamos la respuesta temprana a la infección de células HeLa por *T. cruzi*, no encontramos diferencias en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético [179]. Para confirmar que el aumento en la respiración no se trataba de un mecanismo general inducido por *T. cruzi*, determinamos parámetros de la respiración en estas células 24hpi respecto al control, y efectivamente no encontramos cambios significativos a nivel de la respiración (**Figura 13**).

#### HeLa



**Figura 13. QO2 en células HeLa.** Curva de QO<sub>2</sub> obtenida al agregar oligomicina (2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M) y AA-ROT (1  $\mu$ M cada una) en control y células HeLa infectadas con *T. cruzi* 24 hpi. Las flechas indican el agregado de los diferentes fármacos. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros bioenergéticos mitocondriales entre ambas condiciones.

Luego quisimos estudiar si el aumento de la respiración se podía asociar también a cambios en la velocidad de la glucólisis, para lo cual determinamos el QO<sub>2</sub> y la producción de protones (*PPR: proton production rate*) frente al agregado de glucosa como única fuente de energía exógena en presencia o ausencia del inhibidor de la glucólisis 2-desoxiglucosa (2DG). Al agregar glucosa al medio este se acidifica dado que

luego de la glucólisis, el piruvato entra al ciclo de Krebs, generándose CO<sub>2</sub> el cual puede difundir al medio y formar junto con el agua ácido carbónico. Luego al agregar oligomicina, se bloquea la producción de ATP a través de la respiración y el piruvato entonces es convertido a lactato por lo cual acidifica aún más el medio (se observa un aumento de PPR). No se encontraron diferencias significativas en la capacidad glucolítica entre los controles y los cardiomiocitos infectados (Figura 14 A, B). También estudiamos los niveles de glucosa y lactato en el sobrenadante de células infectadas respecto a los controles y tampoco encontramos cambios significativos entre ambas condiciones en el consumo de glucosa, ni en la producción de lactato (Figura 15) Finalmente, con el fin de evaluar la oxidación de ácidos grasos endógenos como fuente de energía, comparamos el QO<sub>2</sub> mitocondrial en presencia o ausencia de etomoxir, inhibidor de la carnitinapalmitoil-transferasa-I, no encontrando diferencias en la capacidad de oxidación de ácidos grasos entre las muestras infectadas y controles (Figura 14 C, D).



**Figura 14. Evaluación del metabolismo de la glucosa y de ácidos grasos.** (A) Cinética de la respuesta PPR de los cardiomiocitos control e infectados (24hpi) expuestos a glucosa (10mM), oligomicina (2 $\mu$ M) y 2-DG (100mM). (B) Respuesta del consumo de oxígeno, QO<sub>2</sub>, de los cardiomiocitos control e infectados 24hpi a glucosa (10mM), oligomicina (2 $\mu$ M) y 2-DG (100mM). (C, D) Curva de la respuesta de QO<sub>2</sub> en ausencia (C) o presencia (D) del inhibidor etomoxir (100  $\mu$ M), oligomicina (2 $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M), y AA- ROT (1  $\mu$ M cada uno) de cardiomiocitos control e infectados 24hpi. El medio de cultivo utilizado fue el *Human Cardiomyocytes Primary Cell Culture (Celprogen).* 



**Figura 15. Medida de glucosa y lactato en el sobrenadante de cultivo. Se** midió la cantidad de glucosa y lactato en el sobrenadante de cultivo de células control (C) e infectadas (I) a distintos tiempos post interacción. (T0, T3, T6, T10, T24hpi), utilizando el equipo Bioprofile Basic 2 Analyzer (Nova biomedical).

# La infección de cardiomiocitos humanos con *T. cruzi* induce un aumento del contenido mitocondrial.

Teniendo en cuenta la sobre expresión de genes relacionados con la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa, y el incremento en la respiración de cardiomiocitos infectados, decidimos estudiar si estos resultados se correlacionaban con un aumento del contenido mitocondrial. Para ello, cuantificamos ADN mitocondrial (ADNmt; ver Materiales y Métodos) y encontramos un aumento de 6 veces en la cantidad relativa de ADNmt respecto al nuclear en cardiomiocitos infectados (Figura 16 A). Luego estudiamos la expresión de citocromo c en cardiomiocitos infectados respecto al control mediante inmunofluorescencia, encontrando también un aumento del mismo (Figura 16 B, C). Es importante resaltar que la forma de la mitocondria observada en las células infectadas

es del tipo "anillo de dona" (ring-like donut), la cual ha sido asociada con un aumento leve en la generación de especies reactivas del oxígeno a nivel mitocondrial [193, 194]. Evaluamos los cambios a ese nivel con la sonda DCFH-DA, capaz de detectar especies reactivas del oxígeno intracelulares, y encontramos aproximadamente el doble de intensidad de fluorescencia de la sonda en las células infectadas (Figura 16 D). Finalmente, dado que PGC-1a está descrito como un regulador de la biogénesis mitocondrial [195], medimos su expresión por qRTPCR, y no encontramos diferencias significativas entre células control e infectadas (Figura 16 E). Estos resultados sugieren cardiomiocitos infectados que los aumentan su contenido mitocondrial independientemente de PGC-1 $\alpha$ , lo que genera un aumento en la respiración de estas células y el consecuente aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno. Cuando evaluamos si se observaba un aumento en el contenido mitocondrial en células HeLa y células primarias HUVEC infectadas no observamos cambios en el contenido de ADNmt de estas células (Figura 16 A).



В



T. cruzi. Infected

D









**Figura 16. Evaluación del contenido mitocondrial y producción de ROS. (A)** Cuantificación del ADNmt con respecto al ADN nuclear en cardiomiocitos, HeLa y células HUVEC infectadas (I), versus los controles (C) respectivos a 24 hpi determinados por qRTPCR. Los valores son promedios de tres repeticiones biológicas ± SEM. p  $\leq$ 0.001. (B) Microscopía confocal usando el anticuerpo anti-citocromo c (dilución 1/100) y DAPI para tinción del ADN luego de 24 hpi. Las flechas blancas denotan la presencia de amastigotas intracelulares.

**(C)** Medida del promedio  $\pm$  SD de la intensidad de fluorescencia de las células infectadas y controles. \*\*p $\leq$  0.001. **(D)** La producción de ROS 24 hpi fue evaluada mediante el uso de la sonda fluorescente DCFH-DA. Los resultados se expresan gráficamente como porcentajes de la intensidad de fluorescencia respecto a las células control. Los valores muestran los promedios  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado (C = células control e I = infectadas; \*\*\*p <0,002). **(E)** Cuantificación relativa de PGC-1 $\alpha$  por qRTPCR 24hpi en controles (C) y cardiomiocitos infectados (I). Los valores representan el promedio de tres réplicas biológicas independientes.

#### Activación de la vía AKT/mTORC1 en cardiomiocitos infectados.

En los cardiomiocitos infectados, junto con el aumento de expresión de genes del metabolismo energético, encontramos un aumento en la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas (Figura 11). Esto nos llevó a plantearnos la hipótesis de que el responsable de estos cambios de expresión pueda ser el complejo mTORC1, dependiente de AKT. mTORC1 cumple múltiples funciones celulares, entre ellas coordina la actividad mitocondrial y la síntesis de proteínas [196]. Para evaluar si mTORC1 se encontraba activado en cardiomiocitos infectados, estudiamos el estado de fosforilación de distintas proteínas de la cascada de señalización de mTORC1 (AKT, 4EBP1, SP6). Encontramos a las 24hpi, una mayor expresión de los niveles de fosfo-AKT, fosfo-mTOR, fosfo-4EBP1 y fosfo –p70S6 en cardiomiocitos infectados vs el control (Figura 17).



**FIGURA 17.** Análisis de la vía AKT / mTORC1. (A) Análisis mediante Western blot de AKT, mTOR, 4EBP1, p70S6k fosforilado y no fosforilado, en muestras control y cardiomiocitos infectados a las 24 hpi. GAPDH se utilizó como control de carga. (B) Análisis de densitometría de los Western blot. Los valores representan el promedio ± la desviación standard de dos o tres réplicas biológicas independientes (\*p <0.05).

Estos resultados nos muestran que la vía AKT/mTORC1 se encuentra activada en los cardiomiocitos infectados. Con el fin de estudiar si la activación de mTORC1 está involucrada en el aumento del metabolismo energético, tratamos los cardiomiocitos con rapamicina (inhibidor específico de mTORC1). En primer lugar, confirmamos por Western blot que la rapamicina inhibe la vía mTORC1 en nuestras condiciones experimentales (Figura 18 A y B), y posteriormente determinamos la tasa de consumo de oxígeno, demostrando que se inhibe el aumento en la respiración máxima y la reserva respiratoria de cardiomiocitos infectados y tratados con rapamicina (Figura 18C). Además, el aumento del ADNmt observado en las células infectadas también fue revertido en las células tratadas con rapamicina (Figura 18D).

5



**Figura 18.** Efecto de la rapamicina. (A) Análisis de Western blot de la proteína de p70S6k fosforilada y no fosforilada en cardiomiocitos control e infectados a 24 hpi (C, I), frente a las mismas células tratadas con rapamicina durante 24 h antes de la infección (CR, IR). (B) Análisis densitométrico de dos experimentos independientes que muestran los niveles de expresión de p-p70S6k. Se normalizó contra la proteína no fosforilada de las células control (\*p <0,05). (C) Respuesta cinética de QO<sub>2</sub> a oligomicina (2.0  $\mu$ M), FCCP (1,0  $\mu$ M) y AA-ROT (1,0  $\mu$ M cada uno) en cardiomiocitos infectados y controles 24 hpi con y sin tratamiento de rapamicina (2,5 mM durante 24h antes de la infección). Las flechas indican la inyección de las diferentes adiciones. Se calcularon la respiración basal (sin fármaco agregado) y respiración máxima (QO<sub>2</sub> después de la adición de FCCP) con y sin el tratamiento con rapamicina. Cada punto de datos representa el promedio ± SEM n = 5. p <0.05. (D) Cambios de expresión relativa del gen de ADNmt en relación al gen nuclear beta actina en cardiomiocitos infectados (I), cardiomiocitos infectados tratados con rapamicina (2.5  $\mu$ M) (CR) versus células control a las 24 hpi (C). Los valores son el promedio de tres réplicas biológicas ± SEM (p <0.0002).

Mostramos además que la rapamicina en las concentraciones usadas no altera la viabilidad de los cardiomiocitos y no inhibe la vía mTORC2 (Figura 19 A y B).

Α



В



**Figura 19. Evaluación de la viabilidad celular y de mTORC2 después del tratamiento con rapamicina. (A)** La reducción de resazurina (Sigma) se utilizó para evaluar la viabilidad de las células tratadas con rapamicina a diferentes concentraciones durante 24 h. La viabilidad de las células sin rapamicina se consideró como 100%. (B) Evaluación de mTORC1 y mTORC2 en cardiomiocitos tratados con rapamicina (2.5 μM) durante 24 h, luego los mismos fueron lavados

con PBS e infectados con *T. cruzi*. Los extractos proteicos se tomaron 24 hpi. La expresión relativa de p-AKT ser 473 se normalizó frente a AKT total para la evaluación de mTORC2. La misma membrana fue luego evaluada para mTORC1 con el anticuerpo p-p70S6k normalizado contra el p70S6k no fosforilado. Al costado se muestra el análisis de densitometría del Western blot para mTORC2. Los valores representan la media ± desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes.

En resumen, estos resultados nos muestras que a tiempos cortos de infección los cardiomiocitos inducen un aumento de la respiración y del contenido mitocondrial dependiente de mTORC1.

#### **Resultados relacionados al Objetivo 3**

#### Evaluación de fármacos que interfieren con el metabolismo energético.

Como fue expuesto en la introducción, el abordaje clínico de enfermedades infecciosas no sólo busca actualmente eliminar el agente patógeno, sino también desarrollar terapias dirigidas al hospedero, como ya existen algunos ejemplos con parásitos como P. falciparum [124] [125], T. brucei [126], y Leishmania [127] [128]. Dado que encontramos cambios a nivel energético en los cardiomiocitos infectados (un aumento de la respiración a tiempos cortos de infección), que logran ser revertidos con el uso del fármaco rapamicina, nos preguntamos si la posibilidad de inhibir esta respuesta inducida por T. cruzi puede tener un efecto en la modulación de la infección/ replicación del parásito. Decidimos evaluar si la rapamicina y otros fármacos que directa o indirectamente afectan el metabolismo energético (Tabla 1) son capaces de intervenir en la infección/replicación del parásito. En los casos en donde encontremos mayor infección/replicación, podemos pensar que el proceso intervenido por el fármaco es un proceso que permite a la célula defenderse de la infección y, al afectarlo, el parásito lograría ser más exitoso en su infección/replicación. En el caso de encontrar una disminución de la infección/replicación por el uso del fármaco, podríamos pensar que el parásito se beneficia del proceso intervenido para incrementar su infección/replicación, y recíprocamente, al inhibir dicho proceso, el parásito podría disminuir su capacidad infectiva/replicativa.

Con este fin se trataron las células durante 24hs con los diferentes fármacos, se lavaron las células y se infectaron con una cepa de *T. cruzi* capaz de expresar el gen *lacZ* que

codifica para la enzima β-galactosidasa de *E. coli*, el cual puede ser utilizado como medida indirecta de la cantidad de parásitos presentes (ver Materiales y Métodos). A las 24 hpi se agregó el sustrato CPRG, que en presencia de β-galactosidasa cambia de amarillo a rojo, y se midió la absorbancia a 595nm. Además, en los casos en los cuales se observaron cambios en la cantidad de parásitos, se estudió la viabilidad de las células expuestas a los distintos fármacos, mediante el ensayo de resazurina (indicador de oxido-reducción usado en ensayos de viabilidad celular, ver Materiales y Métodos). Los resultados se expresan en porcentaje respecto al control. En el caso de las células infectadas con los parásitos expresando la enzima β-galactosidasa, el control son las células infectadas sin ser expuestas al fármaco. En el caso de los ensayos de viabilidad utilizando resazurina, el control son las células sin exposición al fármaco **(Figura 20).** 







**Figura 20**. **Evaluación de la infección/replicación de** *T. cruzi* **frente a fármacos capaces de modular el metabolismo energético.** Porcentaje de infección/replicación del parásito 24 hpi, en cardiomiocitos tratados con los distintos fármacos a diferentes concentraciones durante 24h previo a la infección (gráfica negra). Se consideró 100% de infección a los cardiomiocitos infectados sin el tratamiento de fármacos. Para algunos de estos fármacos también se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de reducción de resazurina (gráfica verde). La viabilidad de las células sin el fármaco se consideró como 100%. Cada punto de la curva representa el promedio ± la desviación estándar de 5 réplicas técnicas en dos experimentos.

En base a los resultados obtenidos, queremos destacar que con el fármaco rapamicina no obtuvimos cambios significativos en la infección/replicación del parásito, lo que indicaría que el aumento de respiración observado anteriormente en los cardiomiocitos infectados no constituye un mecanismo de defensa del hospedero en nuestro modelo. Con los fármacos galloflavina (inhibe LDHA y B) y metformina (inhibe complejo I respiración), al igual que con rapamicina, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de infección respecto al control. Los fármacos cúrcuma, aicar e imatinib presentaron una disminución del porcentaje de parásitos de al menos 70% para algunas de las concentraciones ensayadas, pero la viabilidad celular también descendió de forma similar en dichas concentraciones.

En el caso de visnagin (inhibe la malato deshidrogenasa mitocondrial, MDH2, la cual encontramos sobreexpresada en los cardiomiocitos infectados) se observó una disminución de la cantidad de parásitos a aproximadamente 70%, y aunque la viabilidad también disminuyó (a aproximadamente 85%), su descenso fue menor que la de los parásitos por lo que, aunque leve, parece haber un efecto neto del fármaco sobre el parásito. En el caso de atovaquone (inhibe complejo II respiración *P.falciparum*), a 50  $\mu$ M, se observó un descenso a aproximadamente 80% en la cantidad de parásitos, sin afectarse la viabilidad celular. Observando estos parásitos al microscopio, los mismos presentaban una menor movilidad.

## **Resultados relacionados al Objetivo 4**

Una de las características más destacables de *T. cruzi* es su capacidad de infectar casi cualquier célula nucleada. Esta característica es fundamental para lograr su propagación y persistencia. Los resultados mostrados a continuación buscan comparar la respuesta inducida a tiempos cortos de infección (de 0-6 hpi) en tres tipos de células diferentes: los macrófagos, células inmunes claves para el control del parásito, células epiteliales, que constituyen la primera barrera contra la infección, y células cardíacas, implicadas en la más grave consecuencia de la enfermedad de Chagas, la CCC. Si bien existen estudios transcriptómicos de la respuesta a la infección de *T. cruzi* en diversos tipos celulares (Tabla 2), los mismos presentan gran variabilidad en el diseño de los experimentos de infección, los tiempos analizados, y las cepas de *T. cruzi* utilizadas, entre otros, lo cual dificulta un estudio comparativo de los resultados entre los distintos transcriptómicos llevados a cabo en nuestro laboratorio, utilizando la misma tecnología, la misma cepa de *T. cruzi* (Dm28c), tiempos de interacción y de infección similares, y las mismas proporciones parásito:célula, entre otros.

El objetivo es entender qué vías metabólicas específicas es capaz de modificar *T. cruzi* en cada tipo celular, así como aquellas vías comunes a tiempos cortos de infección.

# La respuesta de las células hospederas a la infección por *T. cruzi* se caracteriza por regular cientos de genes.

Decidimos comparar la respuesta a tiempos cortos de infección (0, 3 y 6 hpi) en los tres tipos celulares. Estos tiempos involucran los procesos de adhesión celular, e incorporación en la vacuola parasitófora. Primero evaluamos los porcentajes de infección y replicación del parásito en los tres tipos celulares luego de 2 horas de interacción. Encontramos niveles similares de infección (Figura 21 A y B), por lo cual la comparación posterior de niveles de expresión de genes entre los tres tipos celulares no va a depender de que un tipo celular este mucho más o menos infectado que el otro. Los genes que mostraron una probabilidad del 99% de ser diferencialmente expresados ( $p \le 0.01$ ) y con al menos dos veces cambio en su expresión en la infección respecto al control (FC-*Fold Change*  $\ge$  2) en al menos dos tiempos fueron considerados

en los análisis subsiguientes. Al evaluar los resultados de expresión génica encontramos que la cantidad de genes diferencialmente expresados están principalmente sobre-expresados en células epiteliales y cardiomiocitos, mientras que en macrófagos hay más genes sub-expresados (Figura 21 C). Las células HeLa y cardiomiocitos sobre-expresan aproximadamente 190 y 240 genes, los macrófagos alrededor de 500. En los cardiomiocitos y las células epiteliales, la mayoría de los genes que se sobre-expresaron a t0 permanecen así durante t3 y t6 (Figura 22 B y C), mientras que en el caso de los macrófagos hay más especificidad en la regulación de los genes sub-expresados, los genes de las células epiteliales muestran diferencias específicas a los tiempos t0 y t3, con pocos genes sub-expresados a t6 en relación a t0 y t3. (Figura 22 E). En los macrófagos, la mayoría de los genes sub-expresados a t3 y t6 se compartieron, en contraste con los genes a t0 (Figure 22 D). Finalmente, en los cardiomiocitos infectados, los genes sub-expresados en al menos dos tiempos resultaron ser muy pocos (apenas 7) (Figura 22 F).



Figura 21. Porcentajes de infección /replicación y cantidad de genes diferencialmente expresados. (A) Porcentaje de infección para cada tipo celular determinado mediante tinción con DAPI e inmunofluorescencia, contando la cantidad de células infectadas sobre el total de células. Se contaron al menos 900 células para cada población. Los datos se analizaron mediante el Test de ANOVA y post-hoc de Tukey (B) Medida del promedio de la cantidad de amastigotas por célula infectada, promediando la cantidad de amastigotas por célula infectada, promediando la cantidad de amastigotas por células infectadas. Se analizaron al menos 200 células infectadas para cada tipo celular. (C) Número de genes diferencialmente expresados en al menos dos de los tres tiempos (FDR $\leq$ 0.01) con un *Fold change*  $\geq$  2 para cada tipo celular. En rojo se muestran los genes sobre-expresados, y en verde los sub-expresados.



72


Figura 22. Diagrama de Venn de genes sobre y sub-expresados en los distintos tipos celulares a los distintos tiempos analizados.

## La respuesta de la célula hospedera a la infección por *T. cruzi* es principalmente célula - específica.

En base a un análisis jerárquico de *clusters* de los genes diferencialmente expresados (GDE) se observaron claras diferencias entre los tres tipos de células (Figura 23A). Cabe destacar que luego de la infección los transcriptos de células epiteliales, macrófagos y cardiomiocitos siguen siendo fundamentalmente dependientes del tipo celular (Figura 23A). Las células epiteliales y los macrófagos se agruparon más cercanos respecto a los cardiomiocitos. El análisis de diagramas de Venn de los GDE reveló una regulación de la transcripción heterogénea y específica para cada tipo celular, siendo muy pocos los genes sobre o sub expresados compartidos (Figura 23B y C). En contraste, los genes que

se expresan y se comparten entre los controles de los tres tipos celulares se superponen en su mayoría **(Figura 23D)**. Esto último muestra que las diferencias que observamos en los cambios de expresión debidos a la infección con *T. cruzi* no son por una diferencia inicial/basal de expresión de cada tipo celular.

Si bien las diferentes células infectadas no inducen cambios de expresión en los mismos genes luego de la infección, el análisis ontológico y de vías biológicas reveló que hay vías compartidas, principalmente entre células epiteliales y macrófagos, mientras los cardiomiocitos muestran un perfil diferente **(Tabla 5)**. Estos resultados son esperables considerando el agrupamiento encontrado en el análisis jerárquico de *clusters* (**Figura 23A**). Además, es importante considerar que las células epiteliales son células inmunocompetentes, poseyendo mecanismos de detección microbiana, y expresando un conjunto específico de moléculas de reconocimiento de patrones moleculares y sus componentes de señalización, así como moléculas efectoras antimicrobianas [197-200]. Esto les permite tener un importante rol en la respuesta inmune innata contra microorganismos.

Α





**Figura 23. Respuesta célula – específica de Cardiomiocitos, Macrófagos y células Epiteliales. (A)** Análisis jerárquico de genes diferencialmente expresados luego de la infección con *T. cruzi* en al menos un tipo celular. **(B y C)** Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados (sobre y sub expresados) entre los tres tipos celulares. **(D)** Diagrama de Venn de los genes expresados en alguno de los tres tipos celulares de muestras controles, no infectadas.

Vías Biológicas (sobre-representadas DEG)	THP1	HeLa	Cardio		
Metabolismo de Proteínas					
Iniciación de la traducción eucariota			*		
Traducción			*		
Metabolismo Energético					
Ciclo del ácido cítrico			*		
Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa			*		
Vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR	*	*			
Respuesta inmune / inflamación					
Activation de la vía canónica de NF-кВ	*	*			
Vía de señalización p38 MAPK	*	*			
Vía de señalización por Interferon – γ	*	*			
Interferon α y β	*				
Receptores de membrana					
Vía de señalización por el receptor EGF (ErbB1)	*	*			
Vía de señalización por el receptor PDGF	*	*			
Señalización por el receptor TGF- β	*	*			
Señalización por la vía del receptor TNF-α	*	*			
Señalización por TLR endógenos	*	*			
Cascada de la vía TRL3	*				
Cascada de la vía TLR4	*				
Control del ciclo celular					
Señalización por quinasas tipo polo en el ciclo celular	*				
Señalización por aurora quinasas	*	*			
Vía de p53	*				
Interacciones celulares					
Interacciones de la superficie celular de la familia de integrinas	*	*			
Eventos de señalización mediados por quinasas de adhesiones focales	*	*			
Vías de adhesión de nectinas	*	*			
Respuesta de citoquinas					
Eventos de señalización mediados por CXCR4	*	*			
Eventos de señalización mediados por IL1	*	*			
Eventos de señalización mediados por IL12	*	*			
Eventos de señalización mediados por IL23	*	*			
Eventos de señalización mediados por IL5	*	*			

Vías Biológicas (sub-representadas DEG)	THP1	HeLa	Cardio
Biosíntesis del colesterol	*		
Metabolismo de lípidos y lipoproteínas	*		

Tabla 5. Vías diferencialmente representadas (p≤0.05) en Macrófagos, células epiteliales y cardiomiocitos.

#### Las vías relacionadas con la respuesta inmune/inflamatoria son las más sobrerepresentadas en células epiteliales y macrófagos.

Las vías relacionadas a la respuesta inmune y la inflamación son las vías más sobrerepresentadas tanto en macrófagos como en células epiteliales. Las comunes a ambos tipos celulares son: señalización por interferón-γ (IFN- γ), señalización a través de citoquinas inflamatorias como IL12, IL23 (ambas capaces de activar la vía IFN- y [201, 202]), vías de señalización por IL1 (es liberada en respuesta al factor de necrosis tumoral alfa- TNF- $\alpha$ ) e IL5, señalización por TNF- $\alpha$ , señalización por el factor de crecimiento transformante beta - TGF- $\beta$ , la vía de NF $\kappa$ B y la vía de PI3K/AKT/mTOR, y las vías de interacciones celulares (interacciones de integrinas y vías de adhesión focal, muchas de la cuales señalizan respuestas inmunes e inflamatorias [203]). Cabe destacar que la activación de las vías de señalización por receptores de membrana de EGF (factor de crecimiento epidérmico) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) están también sobre-representadas en estas células y la interacción de alguna molécula de T. cruzi con estos receptores podría activar la vía PI3K/AKT/mTOR [204, 205]. La señalización por la quinasa Aurora A involucrada en la progresión del ciclo celular [206] también se encuentra aumentada en ambos tipos celulares. La inducción de las vías de señalización de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL12, sugieren que los macrófagos se activan de manera clásica [207]. Los macrófagos también presentan una sobre-representación de la vía de señalización por interferón tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y de la vía p53 relacionada con el detenimiento del ciclo celular (Tabla 5). Validamos mediante qRTPCR algunos de los genes sobreexpresados relacionados al sistema inmune y la respuesta a estrés en macrófagos (IL8,

**RESULTADOS** 

CXCL2, TNFα, NF-κB, PTX3 y SOD2) (Figura 24A). En el caso de IL8, su expresión fue validada también por ELISA (Figura 24B). En los macrófagos encontramos la inducción de receptores *Toll like*, los cuales son claves en la respuesta inmune innata, y terminan, por distintos intermediarios, activando el factor de transcripción NF-κB, involucrado en la respuesta inflamatoria, o el factor de transcripción IRF3 o IRF7 que inducen interferones tipo I: IFN $\alpha$  y IFN $\beta$  [100]. Particularmente encontramos un aumento significativo de las vías de señalización de TLR 3 y 4, los que terminan activando NF-κB (a través de Myd88) e IRF3 (a través de TRIF). De los 10 TLRs descritos en humanos, TRIF es activado sólo por los TLR3 y 4. Tanto en macrófagos como en células epiteliales encontramos una sobre-representación de la vía de activación de TLR por ligandos endógenos, los que generalmente activan las vías TLR2 y 4. En el caso de los macrófagos, demostramos la activación de NF-kB analizando la expresión de IkB, un potente inhibidor de NF-κB [208]. Encontramos que se expresa a los 15 minutos después de la infección, pero a los 30 minutos su expresión disminuye drásticamente (Figura 24C). Utilizamos LPS como control positivo de inducción de NF-kB [209]. La disminución del represor IkB, libera a NF-kB, provocando su translocación nuclear y su unión a elementos promotores de κB para activar la expresión de los genes relacionados con la respuesta inflamatorio que están bajo su control [208]. En células HeLa infectadas se observa la sobre-expresión de muchos genes de la vía NF-kB (ANEXO 1).

Finalmente, los cardiomiocitos presentan una respuesta específica aumentando la expresión de genes de la respiración mitocondrial y síntesis proteica **(Tabla 5)**, como fue demostrado anteriormente. Respecto a respuestas relacionadas con el sistema inmune, hay pocos genes sobre-expresados, aunque algunos genes pro-inlflamatorios como IL6, MIF *(Macrophage Migration Inhibitory Factor)* y PTX3 (Pentraxina 3, la cual es inducida por TNF- $\alpha$ ), antiinflamatorios como LILRB3 y IL4R, quimioatrayentes como CXCL14 y CKLF y otros genes como galectinas se encuentran sobre-expresados. Es de desatacar la alta sobre-expresión en nuestro modelo de HLA-C (entre 8 y 14 veces), perteneciente a los HLA de clase I, lo que puede sugerir que la infección provoca que estas células aumenten su capacidad de presentar antígenos para combatir la infección.



**Figura 24.** Análisis de la expresión de genes y vías en THP1. (A) Validación por qRTPCR de algunos genes sobre-expresados en THP1 3hpi. Los resultados son relativos al control. Se muestra en valor promedio de tres réplicas biológicas ±SEM. \* denota p ≤0.05. (B) A la derecha se muestra resultados de un Elisa de II8 en células THp1 infectadas respecto al control a las 3hpi. \* denota p ≤0.05. (C) Evaluación de la vía NF-κB, mediante Western blot del supresor de la vía iκB a los 15, y 30 minutos post infección. LPS se utilizó como control positivo.

#### T. cruzi es capaz de inducir características senescentes.

La senescencia es un estado celular que se activa frente a distintos tipos de estrés, entre los cuales se encuentra el estrés oxidativo, el daño al ADN [210], y la activación de NFκB [211]. Nosotros encontramos en cardiomiocitos infectados un aumento de especies reactivas del oxígeno (Figura 16D). A su vez encontramos un aumento de la vía AKT/mTORC1. Recientemente se mostró que un aumento de ROS puede llevar a la activación de mTORC1, el cual mediante la vía S6k puede fosforilar HDM2 (regulador del gen supresor tumoral p53). La fosforilación de p53 puede generar un aumento de sus blancos, como p21, deteniendo así el ciclo celular, e induciendo un fenotipo senescente [81]. Por otro lado, mTORC1 también es capaz de inducir proliferación [71]. Con el fin de estudiar la proliferación en cardiomiocitos infectados, utilizamos la sonda CFSE y 0, 24, 48 y 72hpi analizamos la proliferación por citometría de flujo [212]. Mientras que a 0, 24 y 48hpi no vimos una disminución en la proliferación, a las 72hpi sí observamos menor proliferación en los cardiomiocitos infectados (Figura 25A). Teniendo en cuenta estos resultados sumado a que los cardiomiocitos infectados aumentan la expresión de IL6 y mmp1, ambos considerados genes del FSAS- fenotipo secretor asociado a senescencia-, el cual incluye citoquinas inflamatorias y componentes de la matriz extracelular [87, 213, 214, 215], decidimos evaluar uno de los marcadores clásicos de senescencia: la actividad  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia, y encontramos un aumento significativo de la misma a las 72 hpi, mientras que no hay cambios significativos a las 24 hpi (similar a lo encontrado en el perfil de proliferación) (Figura 25B).

Asimismo, observamos, que los macrófagos sobre-expresan IL8, IL6, NF-κB1, IL1B, CDK6, y las células epiteliales: IL6, IL8, NFKB1, IL1A e IL1B, todos pertenecientes al FSAS.

Además, el estado senescente puede ser inducido por estrés generado por el daño al ADN [210], y la activación de NF-κB [211]. Un trabajo anterior publicado por nuestro grupo muestra que las células HeLa infectadas desencadenan daño en el ADN [179] y probablemente la activación de la vía AKT/mTOR y NF-κB **(Tabla 5).** Los macrófagos infectados también muestran una sobre-representación de las vías AKT / mTOR, y la vía NF-κB **(Tabla 5).** En el caso de los macrófagos la activación de la vía NF-κB fue

**RESULTADOS** 

demostrada **(Figura 24C).** Considerando toda esta información y datos de otros autores que muestran que las células HeLa y macrófagos infectados inducen la vía AKT / mTOR [78] [79], y en el caso de los macrófagos también está demostrado que su infección produce un aumento de especies reactivas del oxígeno [216], exploramos si estas células infectadas expresan el marcador clásico de senescencia: β-galactosidasa [93, 217]. Encontramos un aumento de este marcador en los macrófagos infectados **(Figura 25C).** 



С





Figura 25 Evaluación de la proliferación en cardiomiocitos y la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia cardiomiocitos y macrófagos. (A) Medida de la proliferación en cardiomiocitos infectados y sus respectivos controles a las 0, 24, 48 y72 hpi, determinado con la sonda CFSE. \*p≤0.05 (B) Determinación en solución de la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia en cardiomiocitos controles (C) e infectados (I) a las 24 y 72hpi \*\*p≤0.01 (C) Determinación en solución de la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia en macrófagos controles (C) e infectados (I) a las 72hpi \*\*p≤0.01

RESULTADOS

## Los macrófagos infectados sub-expresan genes relacionados a la síntesis del colesterol.

Con respecto a las vías sub-representadas, la única que encontramos fue la disminución de la biosíntesis de colesterol en macrófagos: 11 genes que codifican enzimas colesterogénicas y 2 genes que codifican enzimas del metabolismo de las lipoproteínas aparecen sub-expresados en la infección principalmente a *t3* y *t6* (Figura 26A). Dos de estos genes, el receptor de LDL (LDLr) y la hidroximetilglutaril-CoA sintasa (HMGCS1), intermediario de la biosíntesis del colesterol fueron validados por qRTPCR (Figura 26B). A pesar de esto, encontramos una sobre-expresión, tanto a nivel de ARNm como de proteína, del receptor OLR1 (Receptor de lipoproteína oxidado de baja densidad 1) (Figura 26B y C). El incremento de OLR1 permitiría aumentar la captación de colesterol exógeno, y una probable hipótesis es que las células para contrarrestar esto, regularían negativamente la biosíntesis de colesterol endógeno. A su vez OLR1 está descrito como un receptor utilizado por *T. cruzi* para invadir las células [166], por lo tanto, su sobre-expresión podría facilitar la infección de macrófagos. OLR1 también se encuentra sobre-expresión en células HeLa, pudiendo estar cumpliendo el mismo rol [179].



82



**Figura 26. Evaluación de la vía del colesterol en THP1. (A)** Valores de cambios de expresión génica (*Fold change*), de los genes relacionados a la síntesis del colesterol en THP1 infectado a distintos tiempos de infección (0,3,6, 12 y 24) en base a datos obtenidos del microarreglo. **(B)** Evaluación por qRTPCR de la expresión de rLDL: receptor de LDL, OLR1: Receptor de lipoproteína oxidado de baja densidad y HMGcS1: hidroximetilglutaril-CoA sintasa en la infección respecto al control. También se muestra un gel de agarosa con los productos de PCR obtenidos para cada gen, así como los valores de expresión génica obtenida en el array de THP1 para estos genes. **(C)** Western blot de OLR1 normalizado con GAPDH en muestras control (C) y muestran infectadas 3 hpi (I) Al costado se muestra la cuantificación del gen en base a un análisis de densitometría de las bandas obtenidas en el Western blot.

В

### Resultados relacionados a aspectos metodológicos

En el marco de esta tesis encontramos que los cardiomiocitos infectados contenían contaminación de ARN proveniente de células Vero, utilizadas por nosotros para propagar los tripomastigotas. Esto nos llevó a estudiar más de cerca el posible impacto de este problema en estudios transcriptómicos (llevados a cabo por microarreglos, secuenciación masiva o qRTPCR) y evaluar diferentes protocolos para tratar de evitar o disminuir la contaminación. En ese marco surge el trabajo titulado *"Host-pathogen transcriptomics: Trypanosoma cruzi as a model for studying RNA contamination".* El mismo se encuentra en la segunda ronda de revisión en la revista Journal of Proteomics. Se adjunta como **Anexo 2**.

## DISCUSIÓN

### DISCUSIÓN

# Respuesta de cardiomiocitos primarios humanos a la infección con *T. cruzi*.

La cardiomiopatía chagásica crónica constituye la manifestación más grave de la enfermedad de Chagas [218]. En el corazón T. cruzi es capaz de infectar una amplia variedad de células, incluidas células endoteliales, del músculo liso, fibroblastos y cardiomiocitos [219]. Ha sido demostrado mediante el análisis histológico de biopsias de corazones de pacientes, que los cambios morfológicos en cardiomiocitos, como por ejemplo la hipertrofia cardíaca, tienen una buena correlación con las manifestaciones clínicas y gravedad de la enfermedad cardíaca [220, 221]. En la primera parte de esta tesis demostramos que T. cruzi es capaz de generar cambios significativos en la expresión génica de cardiomiocitos humanos, favoreciendo la sobre-expresión de cientos de genes en las primeras horas de infección, siendo el metabolismo energético mitocondrial y la síntesis de proteínas las vías más significativamente modificadas (Figura 11A). Es importante resaltar que nuestros resultados coinciden con estudios transcriptómicos llevados a cabo en pacientes con CCC y HCM. En análisis transcriptómicos comparativos de miocardio de pacientes con CCC y DCM, Cunha Neto et al. encontraron que en la CCC y no en la DCM, se sobre-expresan genes implicados en la respiración mitocondrial, y ambas enfermedades exhiben un aumento de la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas [63]. Otro trabajo en el que se compara la expresión de genes de miocardio de pacientes con HCM y pacientes sanos, muestra que las vías más sobre-representadas fueron la síntesis de proteínas y la fosforilación oxidativa [64]. La hipertrofia cardíaca es un paso crítico en el pasaje a la CCC y en nuestro modelo encontramos marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca en los cardiomiocitos infectados, como la metaloproteinasa de matriz 1 (Mmp1) [222] y el receptor del péptido natriurético auricular (NPR1). En conjunto estos resultados validan nuestro modelo de estudio y dan pistas sobre los mecanismos moleculares de patogénesis en la CCC. Otra observación a destacar es que en estudios transcriptómicos de infecciones en ratones con CCC los resultados difieren a los encontrados por nosotros y a los encontrados en pacientes con CCC. En infecciones de ratones con CCC se encuentra una disminución de la expresión de genes relacionados con los distintos complejos de la respiración mitocondrial utilizando las cepas Sylvio y Brasil entre aproximadamente los 30-180 días post-infección [57, 58].

Con el fin de determinar si existe una correlación entre la sobre-expresión de genes relacionados al metabolismo energético con un aumento de la respiración en la infección, analizamos el consumo de oxígeno de los cardiomiocitos infectados a las 6, 17 y 24hpi, y encontramos que la respiración basal y máxima aumentan de manera significativa en los cardiomiocitos infectados, así como la reserva respiratoria (Figura 12). El aumento en la respiración basal indica una mayor demanda de ATP de las células infectadas. Uno de los procesos biológicos que consume más ATP, es la síntesis proteica. Dado que encontramos un aumento en genes relacionados a la síntesis proteica en células infectadas, probablemente el aumento en la respiración sea al menos en parte para sostener y permitir un aumento en la síntesis proteica. Decidimos comparar estos resultados con el modelo de infección en células HeLa, dado que en estudios transcriptómicos llevados a cabo en nuestro laboratorio con estas células, no encontramos diferencias en la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético. En este caso tampoco encontramos diferencias fenotípicas a nivel de la respiración (Figura 13). Una observación a destacar es que otros trabajos que estudian la actividad mitocondrial en respuesta a la infección en modelos de cardiomiocitos murinos describen una disminución de la respiración, tanto en modelos de infección crónica (Vyatkina et al. [60]) como en cardiomiocitos primarios (Estrada y col. [59]). En fibroblastos dérmicos humanos Shah-Simpson et al. [223] y en macrófagos humanos Koo et al. [224], también encontraron un aumento de la respiración mitocondrial en las células infectadas.

Algunas de las diferencias encontradas en infecciones murinas y humanas, tanto a nivel transcriptómico como funcional en aspectos relacionados con el metabolismo energético podrían estar vinculadas a que los ratones tienen una tasa basal metabólica por gramo de peso corporal aproximadamente 7 veces mayor a la de un humano. Esto provoca que los ratones tengan una menor capacidad de mantener una adecuada homeostasis celular frente a diferentes tipos de estrés como por ejemplo ROS, y quizás

87

sea una de las razones por la que no se comporten igual frente a la infección al menos en aspectos metabólicos [225, 226].

En pacientes con CCC hay pocos estudios del estado de la respiración mitocondrial. El trabajo de Teixeira et al. en 5 pacientes con CCC [65], muestra una disminución en los niveles de expresión de la proteína creatina quinasa muscular respecto a pacientes sanos, así como una disminución de su actividad. La creatina quinasa mitocondrial cataliza el pasaje de un fosfato del ATP a la creatina para formar fosfocreatina y ADP. La fosfocreatina difunde rápidamente de la mitocondria al citosol, donde la creatina muscular puede convertir la fosfocreatina nuevamente en ATP y creatina. Esta última difunde a la mitocondria cerrando el ciclo y contribuyendo a la homeostasis energética. Una hipótesis planteada por Cunha-Neto et al. [63] es que el aumento de la expresión de genes relacionados al metabolismo energético encontrados en la CCC, sería un mecanismo compensatorio para evitar una disminución del ATP citoplasmático. Otra observación del trabajo de Teixeira et al. [65], es que encuentran una disminución discreta en los niveles de expresión de la proteína de la subunidad alfa de la ATP sintasa (complejo V de la respiración mitocondrial). También el trabajo de Wan et al. [227] en pacientes con CCC (8 pacientes), muestra una disminución de la proteína de la respiración mitocondrial CYTB. Consideramos que estudiar aspectos relacionados a la respiración mitocondrial en un número mayor de pacientes con CCC ayudaría a elucidar el estado de la respiración en la CCC. Particularmente, dada la diversidad de células presentes en el corazón (cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales, y en el caso de la CCC también infiltrados de macrófagos y células T), pensamos que sería de gran información hacer los estudios sobre biopsias de corazones de los pacientes, así como de cardiomiocitos purificados de las mismas [228].

Con el fin de entender si el aumento de la respiración en la infección se acompañaba además de un mayor contenido mitocondrial o una mayor capacidad de respiración de las células infectadas estudiamos la relación del ADN mitocondrial respecto al ADN nuclear por qRTPCR, encontrando que el mismo aumenta en la infección respecto al control (Figura 16A). También estudiamos en células HeLa y en células humanas endoteliales primarias HUVEC como otro sistema de cultivos primarios, si la infección

88

DISCUSIÓN

inducía un aumento del contenido mitocondrial y no encontramos diferencias significativas respecto al control **(Figura 16A)**. Estos resultados nos indican que el aumento de la respiración y contenido mitocondrial de cardiomiocitos infectados no constituye un mecanismo general de respuesta a la infección por *T. cruzi*. Tampoco sería específico de los cardiomiocitos, dado que en una línea de fibroblastos dérmicos humanos normales se observó un aumento de la respiración frente a la infección, así como un aumento en el contenido mitocondrial [223]. Dado que PGC-1 $\alpha$  es un regulador de la biogénesis mitocondrial [229], determinamos por qRTPCR su expresión en células infectadas vs control y no encontramos cambios en su expresión **(Figura 16E)**, por lo que el incremento del ADN mitocondrial sería independiente de PGC-1 $\alpha$ . De todas formas, no podemos descartar una activación de PGC-1 $\alpha$  a nivel post-transcripcional [195].

Es sabido que los cardiomiocitos utilizan como principal fuente de energía los ácidos grasos, pero también son capaces de utilizar otros sustratos como glucosa, lactato o cuerpos cetónicos [53]. En algunos modelos de infección con patógenos intracelulares se ha observado un aumento de la glucólisis y producción de lactato [230]. Quisimos determinar, por un lado, si el aumento de la respiración se asocia también a un aumento de la glucólisis, para lo cual utilizamos glucosa como único sustrato exógeno, y el inhibidor de la hexoquinasa, 2-desoxi-D-glucosa, no encontrando diferencias en la capacidad glucolítica de las células infectadas (Figura 14A y B). Por otro lado, determinamos si existían diferencias en el uso de ácidos grasos endógenos, para lo cual utilizamos etomoxir (inhibidor irreversible de la carnitina palmitoil transferasa 1) y aunque se observa que utilizan ácidos grasos para respirar, dado que disminuye el consumo de oxígeno al usar etomoxir, las diferencias entre el control y la infección no son significativas. (Figura 14C y D). Estos resultados indican que los cardiomiocitos infectados aumentan su metabolismo oxidativo mitocondrial sin modificar la actividad glucolítica ni de oxidación de ácidos grasos. Dado que, en una línea de fibroblastos dérmicos humanos normales, Shah-Simpson et. al. encontraron un aumento de la entrada de glucosa a las células infectadas [223], quisimos estudiar si se observaban cambios en los niveles de glucosa y lactato en el sobrenadante de células infectadas respecto al control y no encontramos producción significativa de lactato, ni diferencias significativas en los valores de glucosa en el sobrenadante de ambas muestras (Figura **15**). Este resultado supone que en nuestro sistema, en presencia de otros sustratos energéticos, no se utiliza glucosa a tiempos cortos de infección y al no detectarse niveles significativos de lactato, la producción de ATP es toda a expensas de la respiración mitocondrial.

La vía mTORC1 dependiente de AKT regula la actividad y biogénesis mitocondrial, así como la síntesis de proteínas [71, 72, 231-233]. Dado que además de encontrar aumento de genes relacionados con el metabolismo energético, encontramos la sobre-expresión de muchas proteínas ribosómicas y factores de traducción en la infección, nos planteamos la hipótesis de que mTORC1 está en la base de estos cambios, para lo cual estudiamos y demostramos mediante ensayos de Western blot, la activación de esta vía (Figura 17). También encontramos que la activación es específica de mTORC1 y no de mTORC2, ya que no encontramos cambios en la activación de mTORC2 (evaluando la fosforilación de AKT en la serina 473) (Figura 19B). Con el fin de verificar si el aumento de la respiración en la infección se debe a un aumento de mTORC1, utilizamos un inhibidor específico de mTORC1, rapamicina, y evaluamos la respiración en presencia del fármaco. No se observaron cambios en el consumo de oxígeno en la infección respecto al control al usar rapamicina 24hs previo a la infección (Figura 18C). Además, el uso de rapamicina revirtió el aumento en el contenido mitocondrial de células infectadas respecto al control (Figura 18D). Morita y colaboradores [72] mostraron que mTORC1 controla la actividad y biogénesis mitocondrial promoviendo la traducción de ARNm relacionados con las mitocondrias codificados por el núcleo, al fosforilar proteínas de unión al factor de inicio de la traducción 4E: 4E-BPs, lo cual habilita la traducción de estos ARNm. Nosotros encontramos aumentada la fosforilación de 4E-BP1 en la infección, por lo que en nuestro modelo el aumento del contenido mitocondrial podría estar relacionado con este resultado. Finalmente, encontramos que la forma de las mitocondrias de los cardiomiocitos infectados era de tipo "dona", la cual se asocia con un aumento leve de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria [193, 194], que puede explicarse por el aumento de la respiración. Fuimos a evaluar las especies reactivas de oxígeno en las células infectadas y encontramos que las mismas aumentan aproximadamente dos veces respecto al control (Figura 16D). Es importante considerar que un leve aumento de ROS puede generar arresto del ciclo celular y producir un aumento de la biogénesis mitocondrial [234]. A su vez un aumento sostenido de ROS también podría generar daño en los cardiomiocitos, perturbando el potencial de membrana mitocondrial [235].

En la **Figura 27** resumimos los resultados encontrados en cardiomiocitos infectados y dejamos planteadas algunas interrogantes al respecto.



#### Figura 27. Resumen de los resultados encontrados en cardiomiocitos humanos infectados.

El esquema plantea la posibilidad de que *T. cruzi* interaccione con algún receptor/es tirosina quinasa y a través de los mismos active el segundo mensajero PI3K, activando luego AKT y mTORC1/ p70S6k y 4EBP-1. En verde se muestra las proteínas para las cuales validamos la sobreexpresión por Western blot. El aumento de p70S6k y 4EBP-1 provocarían un aumento de la expresión de ARN ribosomales y factores de la traducción (resultado encontrado en los experimentos de microarreglos) y un incremento de la síntesis proteica. El hecho de que la activación de mTORC1 provoque un aumento de la síntesis proteica ha sido demostrado en muchos sistemas aunque nosotros no lo validamos en el nuestro, motivo por el cuál adjudicamos un signo de interrogación. El aumento de 4EBP-1 provocaría un aumento del metabolismo energético (72), el cual verificamos en este trabajo, junto con un aumento de ROS el cual podría inducir características senescentes, y a su vez colaborar en la activación de mTORC1 (ambas son hipótesis a confirmar). El perfil del tipo senescente podría contribuir a la persistencia del parásito.

# Evaluación de fármacos que interfieren con el metabolismo energético.

En el caso de la enfermedad de Chagas, la persistencia del parásito es uno de los principales motivos que, al día de hoy, impiden curar dicha enfermedad en la fase crónica. T. cruzi, por diferentes mecanismos, logra persistir décadas en el hospedero. Algunos ejemplos de estos mecanismos son: presencia de enzimas antioxidantes que le permite defenderse de radicales libres, inducción de sobrevida de la célula infectada, multitud de proteínas de superficie que le permiten interaccionar e invadir casi cualquier tipo de célula [19], existencia de amastigotas en estado de dormancia, los cuales son refractarios al tratamiento, así como capaces de diferenciarse periódicamente a tripomastigotas y perpetuar la infección [236]. Estos motivos hacen que T. cruzi sea un parásito muy difícil de eliminar, y a pesar de que la mayoría de los esfuerzos se han dirigido a tratar de lograr la cura parasitológica, la misma aún no ha tenido éxito. La alternativa de buscar terapias dirigidas al hospedero que, aunque no logren eliminar el parásito, puedan ayudar a prevenir el desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo prevenir la cardiomiopatía, son estrategias que apuntarían a la "cura clínica" de la enfermedad. Este tipo de estrategias dirigidas al hospedero ya están siendo evaluadas en otros patógenos intracelulares y persistentes, como por ejemplo Mycobacterium tuberculosis [237, 238] y otros parásitos intracelulares como P. falciparum [124] [125], *T. brucei* [126], y *Leishmania* [127] [128].

Nosotros encontramos una reversión del incremento de la respiración mitocondrial al usar rapamicina, lo cual muestra la posibilidad de revertir un fenotipo inducido por *T. cruzi* en el hospedero con fármacos. Si este mecanismo genera patogénesis y es capaz de ser inhibido, una primera evaluación que podemos hacer *in vitro*, es estudiar si su inhibición afecta la infección/replicación del parásito. Estudiamos el efecto de la rapamicina y otros siete fármacos capaces de intervenir directa o indirectamente en el metabolismo energético, (cuyas características fueron expuestas en la Tabla 1), sobre la infección/replicación del parásito. En el caso de la rapamicina no encontramos cambios

significativos (Figura 20), lo que sugiere que el aumento en la respiración y el posterior aumento en la producción de ROS no constituyen un mecanismo de defensa del hospedero en nuestro modelo, sino un efecto secundario que probablemente dañe los cardiomiocitos, principalmente por el aumento de ROS. Un trabajo llevado a cabo en macrófagos murinos infectados con tripomastigotas derivados de ratones infectados con la cepa Y, mostró una disminución en la invasión al usar rapamicina [79]. Los tiempos de tratamiento pre y post infección utilizados en este trabajo fueron diferentes a los utilizados por nosotros [79]. Por otro lado, otros autores mostraron que el tratamiento con rapamicina en células HeLa infectadas logra inhibir la infección de tripomastigotas metacíclicos de la cepa CL, mientras que aumenta la infección en el caso de que los tripomastigotas sean derivados de cultivos celulares [239, 240]. Estos resultados, en conjunto con los nuestros (en los cuales no observamos cambios en la infección), indican que el efecto de la rapamicina sobre la infección de T. cruzi probablemente dependa de diversos factores entre los cuales se encontrarían las formas particulares de los tripomastigotas (derivados de cultivos celulares, o metacíclicos), la cepa de T. cruzi, el tipo de célula infectada, y los tiempos de tratamiento con el fármaco así como los tiempos post infección a los cuales se mide la invasión.

Con los fármacos galloflavina (inhibe LDH A y B) y metformina (inhibe complejo I de la respiración), al igual que con rapamicina, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de infección respecto al control. Los fármacos cúrcuma, aicar e imatinib presentaron una disminución del porcentaje de parásitos a al menos 70%, para algunas de las concentraciones ensayadas, pero la viabilidad celular también descendió de forma similar en dichas concentraciones (Figura 20), por lo que la medida de una disminución en la infección probablemente se deba al daño generado en las células.

En conjunto estos resultados sugieren que alterar el metabolismo energético, particularmente mediante la intervención en la respiración mitocondrial, no afectaría aspectos relacionados con la infección/replicación del parásito. Cabe destacar que en el trabajo de Shah-Simpson et. al, en una línea de fibroblastos humanos con una deficiente respiración mitocondrial, no se observaron cambios en la replicación de amastigotas [223].

93

DISCUSIÓN

En el que caso de Visnagin (inhibe la malato deshidrogenasa 2 -MDH2, la cual observamos aumentada en la infección), a la concentración de 1mM, se observó una disminución de la infección/replicación del parásito a aproximadamente 70%, y aunque la viabilidad también bajó, su descenso fue menor al observado en la infección/replicación. Esto sugiere que el incremento de MDH2 en la infección, involucrada en el ciclo del ácido cítrico, sería beneficioso para el parásito y por eso la inhibición de esta enzima podría favorecer la disminución de la replicación del parásito.

Con respecto a la atovaquone (inhibe complejo III respiración de *P. falciparum*), se observó para la concentración de 50µM, una disminución a aproximadamente 80% en la infección/replicación del parásito, aunque esto no se observó a mayores concentraciones. Cabe destacar que con este fármaco se observaba al microscopio menor movilidad de los parásitos respecto al control.

# Comparación de la respuesta de células de origen humano infectadas con *T. cruzi*.

Dado que en nuestro laboratorio contamos con estudios transcriptómicos de respuesta a la infección en tres tipos celulares de origen humano: cardiomiocitos, células epiteliales (HeLa) y macrófagos (THP1), llevados a cabo con la misma cepa, Dm28c, mismos tiempos post infección (t0, t3 y t6), misma relación parásitos:células, y misma metodología (micorarreglos de Agilent), lo que nos permite disminuir variables que pueden dificultar las comparaciones, decidimos realizar un estudio comparativo de los resultados de estas respuesta. A pesar de que recientemente fue publicado un trabajo que compara la respuesta transcriptómica del hospedero a la infección con *T. cruzi*, la comparación no considera diferencias entre distintas cepas, distintos modelos de infección (humano y ratón), y distintos tiempos post infección [241].

La primera observación de nuestros resultados es que los tres tipos celulares cambiaron la expresión de cientos de genes frente a *T. cruzi*. Otros autores también han encontrado cambios en cientos de genes en otros modelos de infección como por ejemplo cardiomiocitos murinos y fibroblastos humanos [55, 63, 178]. Encontramos un rápido aumento de genes a t0 (2horas post interacción), en las tres líneas celulares. En

DISCUSIÓN

cardiomiocitos y células epiteliales la mayoría de los genes permanecen sobreexpresados a los demás tiempos (t3 y t6), mientras que en macrófagos muchos genes se comparten sobre todo entre t3 y t6 **(Figura 22).** Los tiempos analizados incluyen la interacción del parásito con la célula para lograr la invasión, y la formación y permanencia en la vacuola parasitófora. El hecho de que muchos genes se compartan a t0 puede significar que las señales que se inducen están principalmente relacionadas con los receptores que se activan en la interacción del parásito con la membrana de la célula hospedera, los cuales inician una serie de cascadas de señalización que se mantienen en el tiempo estudiado.

En base al diagrama de Venn y al análisis de clusters de los genes diferencialmente expresados en cada tipo celular, podemos concluir que la respuesta transcriptómica depende del tipo de célula hospedera (Figura 23). Esto probablemente se deba a diferencias en los receptores de membrana presentes en cada tipo celular. T. cruzi presenta un amplio repertorio de moléculas de superficie pertenecientes a diversas familias multigénicas, (mucinas, MASP, trans-sialidasas entre otros), capaces de interactuar con diferentes receptores, lo que probablemente genere la activación de cascadas de señalización específicas para cada tipo celular. Esta observación también fue encontrada para otro parásito intracelular, Toxoplasma gondii, que también es capaz de infectar distintos tipos de células [242]. El agrupamiento observado en el análisis de cluster entre las células epiteliales y los macrófagos y por otro lado, separados, los cardiomiocitos (Figura 23 A), puede deberse a la similitud de la respuesta encontrada entre los macrófagos y las células epiteliales, aunque también es importarte considerar que los macrófagos (THP1) y las células epiteliales (HeLa) utilizadas en este trabajo son células transformadas, mientras que los cardiomiocitos que se utilizaron son células primarias y estás diferencias también podrían estar contribuyendo al agrupamiento observado.

Entre macrófagos y células epiteliales se compartieron muchas vías relacionadas con el sistema inmune y la inflamación. La respuesta inmune innata constituye la primera barrera de defensa del hospedero frente a una infección y juega un rol esencial en el reconocimiento y la respuesta proinflamatoria contra el patógeno. Las células del

sistema inmune, entre ellas los macrófagos, así como también células estructurales como las células epiteliales y endoteliales [101, 243-245] presentan receptores de reconocimiento de patógenos, estando entre los más relevantes los receptores de tipo Toll (TLRs), capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Las cascadas de señalización por los TLRs terminan generalmente activando el factor de transcripción NF-κB y produciendo citoquinas proinflamatorias como TNF e interferones [100]. Nosotros encontramos en los macrófagos una sobre-representación de la vía de señalización por TLR4, la cual señaliza a través de Myd88, pudiendo ser activada por moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GIPL) del parásito [116, 117]. También observamos una sobre-representación de la vía de señalización de TLR3, el cual señaliza a través de TRIF. Es de destacar que a nivel del sistema inmune innato, una respuesta efectiva contra *T. cruzi* es mediada por la secreción de IL12 y TNF- $\alpha$  dependiente de Myd88, y por la producción de IFNB dependiente de TRIF [114]. Los TLR podrían activarse no solo por PAMPs de T. cruzi, sino también por moléculas endógenas derivadas de la lisis de células infectadas [20], activando principalmente los TLRs 2 y 4. Encontramos la vía de señalización de TLRs por moléculas endógenas sobre-representada tanto en células epiteliales como en macrófagos. La liberación de este tipo de moléculas puede activar TLRs de células vecinas promoviendo un aumento de la inflamación, así como eventos de reparación celular [102] [103].

En macrófagos y células epiteliales encontramos un aumento de la expresión de genes relacionados a la vía del IFN- $\gamma$ . También encontramos en ambos tipos celulares una sobre-representación de las vías que señalizan a través de citoquinas inflamatorias como IL12, IL23, Il1 y TNF- $\alpha$ . La respuesta a IFN- $\gamma$  fue también descrita por Zhang et al. en macrófagos derivados de médula ósea de ratón [246]. Nuestros resultados indicarían una activación clásica de macrófagos, M1, activados por INF- $\gamma$ , y capaces de secretar las interleuquinas inflamatorias Il12, TNF- $\alpha$  y también INF- $\gamma$ . En el caso de los macrófagos de ratón la respuesta encontrada, a pesar de la inducción de genes de IFN $\gamma$ , fue más parecida a la de tipo M2, los cuales se inducen por las citoquinas IL-10 e IL-4 [246]. Estas diferencias en el tipo de activación de los macrófagos, probablemente esté relacionado con las diferentes clases de macrófagos (THP1 humano y médula ósea de ratón), y también con el uso de diferentes cepas de *T. cruzi* (Dm28c y CAI-72). De hecho, los

DISCUSIÓN

resultados de los mismos autores sugieren que los macrófagos derivados de la médula ósea están más predispuestos a la activación alternativa (M2) mientras que los macrófagos activados con tioglicolato están más predispuestos a la activación clásica (M1) [246]. Otro trabajo encuentra que macrófagos humanos purificados a partir de PBMC con la cepa Brasil, no presentan una respuesta inflamatoria significativa frente a *T. cruzi* [247], lo cual respalda la dependencia de la respuesta según el tipo de macrófago/cepa de *T. cruzi.* Una respuesta a IFN-γ también fue encontrada en fibroblastos, células endoteliales, y de músculo liso humanas [184]. Finalmente, en tejido de miocardio de pacientes con CCC también fue encontrada una respuesta a IFN-γ [63]. El trabajo de Luss H. et al. muestra que la inducción de IFN-γ puede llevar a una inhibición del metabolismo energético mitocondrial y un aumento de óxido nítrico - NO [68]. Los corazones de pacientes con CCC presentan importantes infiltrados de macrófagos (50% aproximadamente) [248, 249] que podrían secretar IFN-γ y explicar, al menos en parte, la disfunción cardíaca en la CCC a causa de una disminución del metabolismo energético

Con respecto a las células epiteliales, en el contexto del organismo, el epitelio infectado podría contribuir a la inflamación (a través de la respuesta de interferón, IL12, IL23, IL8, IL6 y muchas quimioquinas como CCL2, CXCL1 y CXCL3) al reclutar células inflamatorias como monocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos y al mismo tiempo contribuir a diseminar la infección. Por otro lado, nuestros resultados en cardiomiocitos infectados muestran una leve respuesta inflamatoria aumentando genes como IL6, MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) y PTX3 (Pentraxina 3, la cual es inducida por TNF- $\alpha$ ), así como algunos genes quimioatrayentes como CXCL14 y CKLF. Destaca la alta sobre-expresión de HLA-C (entre 8 y 14 veces), lo que puede sugerir que la infección provoca un aumento en la capacidad antigénica de estas células. Además, se ha observado que los cardiomiocitos frente a determinadas citoquinas como IFN- $\gamma$  son capaces de aumentar la expresión de MHC de clase I [250], así como en pacientes con CCC se ha encontrado un aumento de moléculas HLA de clase I y II [251]. Por otro lado, se ha observado en infecciones virales un aumento de los HLA de clase I, lo cual podría correlacionarse en algunos casos con problemas de autoinmunidad [252]. En el caso de

97

*T. cruzi* el aumento de HLA-C también podría estar vinculado a la autoinmunidad [253-255].

Los resultados obtenidos indican que la vía PI3K/AKT está activada en cardiomiocitos (Figura 17), además se encuentra sobre-representada en macrófagos y células HeLa (Tabla 5). Otros autores también encontraron está vía activada en macrófagos humanos y de ratón [76, 77], células epiteliales [78], cardiomiocitos de ratón [67] y otros tipos celulares como células gliales de tipo células Schwann [256] y fibroblastos de ratón [76]. También fue demostrada su activación en pacientes con CCC y su activación en células mieloides (macrófagos, por ejemplo) restringiría la infección en el corazón protegiendo a los cardiomiocitos [67]. En general el rol de su activación se relaciona con la capacidad antiapoptótica de esta vía [257, 258]. También es necesaria para el proceso de invasión de T. cruzi [77]. Es de destacar la cantidad de modelos, en los cuales independiente de la cepa de T. cruzi utilizada y el tipo celular y especie (humano o ratón) infectada, muestran una activación de esta vía. Este hecho da fuertes indicios de un rol crucial en la interacción de la célula hospedera con el parásito a la vía PI3K/AKT. Las moléculas de T. cruzi reportadas como capaces de activar esta vía hasta el momento han sido transialidasas en infecciones de células Schwann [73]. También ha sido demostrado que una transialidasa de T. cruzi es capaz de interactuar con el receptor de membrana tirosina quinasa TrKA promoviendo la invasión de células de mamífero y al mismo tiempo permitiendo la activación de la vía PI3K/AKT [259]. En nuestros sistemas de infección en macrófagos y células epiteliales hay una sobre-representación de vías de señalización por otros receptores de la familia tirosina quinasa como PDGF (receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (receptor de factor de crecimiento epidérmico), así como otros receptores como PAR (receptores proteasa activados), TNF (Factor de necrosis tumoral), y TGF-β. Lograr identificar qué receptor o receptores pueden ser capaces de inducir esta vía, entre otras, en diferentes tipos celulares, podría ser de gran utilidad para modular esta respuesta y controlar la infección, la replicación y/o la clínica de la CCC.

Queremos resaltar las características del tipo senescente observadas en los cardiomiocitos y macrófagos (Figura 25). En el caso de los macrófagos, es importante

recordar que las células THP1 tienen mutado el gen p53, por lo tanto, en estas células habría que estudiar si no se activa la vía p16 capaz de inducir senescencia. Teniendo en cuenta que el fenotipo senescente fue encontrado en fibroblastos humanos infectados [96] y también en células T de pacientes con CCC [94, 95], consideramos relevante profundizar sobre el posible rol de la senescencia en la persistencia del parásito en nuestros modelos celulares. La senescencia podría ser una de las opciones que facilitan la persistencia del parásito dado que se convertirían en un reservorio de los mismos. Las células senescentes secretan citoquinas inflamatorias como II6, II1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , capaces de reclutar macrófagos, neutrófilos y otras células inmunes que por un lado representan una defensa contra el parásito y por otro ayudarían a diseminar la infección [260, 261, 262]. Consideramos importante dilucidar los mecanismos que inducen está respuesta en cada tipo celular. Queremos destacar que la forma tipo "dona", encontrada en las mitocondrias de los cardiomiocitos infectados, se asocia con procesos de fusión mitocondrial [263]. Alteraciones en la dinámica mitocondrial han sido observadas en células de melanoma en las cuales se induce la senescencia. En estas células se observó además un incremento de la respiración mitocondrial, el cual fue revertido junto con la inhibición de la secreción de interleuquinas relacionadas con componentes del FSAS, al silenciar la expresión de mitofusinas, proteínas involucradas en los procesos de fusión mitocondrial [264]. Estudiar la dinámica mitocondrial en el contexto de la infección de cardiomiocitos podría permitir comprender su posible rol en relación al metabolismo energético y las características senescentes encontradas.

Finalmente, el único tipo celular en el que encontramos vías metabólicas significativamente disminuidas fue en macrófagos, donde observamos una disminución en la expresión de genes de la biosíntesis del colesterol, principalmente a los tiempos 3 y 6 (**Figura 26**). El estudio de Zhang et al. [246], mediante un metaanálisis de diferentes trabajos transcriptómicos de infección con distintas cepas de *T. cruzi* y células hospederas, encuentra una disminución de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos. Por otro lado, se ha demostrado que el colesterol de la membrana plasmática juega un rol importante en la infección, y se han encontrado resultados opuestos a los antes mencionados, en donde se observa un aumento en los

niveles de colesterol intracelular en fibroblastos con la cepa Brasil [265]. También el trabajo de Hissa et al. muestra que depletar colesterol de la membrana de cardiomiocitos disminuye la infección de *T. cruzi,* por el rol que el colesterol jugaría en la fusión de lisosomas a la membrana [266].

### **CONCLUSIONES**

### **CONCLUSIONES**

- 1. La infección de cardiomiocitos humanos por *Trypanosoma cruzi* es capaz de inducir una reprogramación de dichas células en las primeras horas de infección, a través de cambios en los perfiles de expresión génica de cientos de genes.
- El análisis de vías y procesos más alterados frente a la infección en cardiomiocitos muestra una predominancia de sobre-expresión de genes relacionados a la cadena respiratoria, fosforilación oxidativa y síntesis proteica, similar a lo observado en pacientes con CCC y HCM.
- 3. El aumento de la expresión de genes relacionados a la respiración en cardiomiocitos infectados se correlaciona con un aumento de la respiración basal y máxima, así como del contenido mitocondrial.
- 4. El aumento de la respiración y contenido mitocondrial en la infección de cardiomiocitos está mediado por mTORC1 y es independiente de PGC-1α.
- 5. La rapamicina es capaz de revertir el fenotipo relacionado a un aumento de la respiración en cardiomiocitos infectados, lo que abre la perspectiva del uso de terapias dirigidas al hospedero en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.
- 6. Con los fármacos utilizados no encontramos cambios relevantes en los niveles de infección/replicación del parásito a los tiempos y concentraciones ensayadas.
- La comparación de genes diferencialmente expresados entre cardiomiocitos, células epiteliales y macrófagos humanos a tiempos cortos de infección, muestra que la respuesta es específica para cada tipo celular.
- 8. En macrófagos y células epiteliales se observa la sobre-representación de vías biológicas similares relacionadas principalmente con una respuesta inflamatoria en donde resaltamos las vías de señalización por NFκB, interferónγ, TNF-α, y los receptores del tipo toll o TLRs.
- 9. En los tres tipos celulares encontramos que la vía PI3K/AKT está sobrerepresentada, lo que destaca su relevancia en la interacción célula hospedera - T. cruzi, y abre la perspectiva de modular dicha vía para lograr contribuir al tratamiento de la enfermedad de Chagas.
- Encontramos en los tres tipos celulares la sobre-expresión de genes del fenotipo secretor senescente, así como otros marcadores de senescencia (disminución de la proliferación en cardiomiocitos, actividad beta-galactosidasa asociada a senescencia en cardiomiocitos y macrófagos).

### PERSPECTIVAS

### PERSPECTIVAS

- 1. Verificar la activación de la vía PI3K/AKT en nuestro modelo de infección de macrófagos (THP1) y células epiteliales (HeLa).
- 2. Estudiar qué receptores pueden estar interactuando con diferentes moléculas de *T. cruzi* para inducir la activación de la vía PI3K/AKT. Algunos candidatos en células epiteliales y macrófagos podrían ser los receptores de PDGF y EGF. Para testear esta hipótesis se utilizarían diferentes inhibidores de los receptores.
- Continuar estudiando marcadores del perfil tipo senescente en nuestros modelos de infección. Particularmente en macrófagos y células epiteliales infectadas analizar si existen cambios en la proliferación celular. Analizar mediante Western blot en los tres tipos celulares la expresión de p16 y en HeLa y cardiomiocitos p53 y p21.
- 4. Profundizar en los mecanismos capaces de generar perfiles del tipo senescentes. Por ejemplo, utilizar inhibidores de ROS y evaluar si se observan cambios en la producción de beta-galactosidasa asociada a la senescencia, cambios en la expresión de genes relacionados con el perfil secretor senescente y cambios en los niveles de proliferación.
- 5. Estudiar en biopsias de corazones de pacientes con CCC, así como en cardiomiocitos purificados de dichas biopsias, niveles de los complejos de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, así como el contenido mitocondrial de estas células en relación a pacientes sanos.
- 6. Profundizar en el estudio de fármacos sobre el hospedero con el fin de evitar o disminuir la infección de *T. cruzi* o el desarrollo de la enfermedad de Chagas.

## BIBLIOGRAFÍA

# BIBLIOGRAFÍA

- 1. Junqueira, A.C., W. Degrave, and A. Brandao, *Minicircle organization and diversity in Trypanosoma cruzi populations*. Trends Parasitol, 2005. **21**(6): p. 270-2.
- 2. Vanhamme, L. and E. Pays, *Control of gene expression in trypanosomes*. Microbiol Rev, 1995. **59**(2): p. 223-40.
- 3. El-Sayed, N.M., et al., *The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease*. Science, 2005. **309**(5733): p. 409-15.
- 4. Ouellette, M. and B. Papadopoulou, *Coordinated gene expression by* posttranscriptional regulons in African trypanosomes. J Biol, 2009. **8**(11): p. 100.
- 5. Buscaglia, C.A. and J.M. Di Noia, *Trypanosoma cruzi clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease*. Microbes Infect, 2003. **5**(5): p. 419-27.
- 6. Andrade, L.O., et al., *Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice*. Mol Biochem Parasitol, 1999. **100**(2): p. 163-72.
- 7. Andrade, L.O., et al., *Differential tissue tropism of Trypanosoma cruzi strains: an in vitro study.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010. **105**(6): p. 834-7.
- 8. Vago, A.R., et al., *Kinetoplast DNA signatures of Trypanosoma cruzi strains obtained directly from infected tissues*. Am J Pathol, 1996. **149**(6): p. 2153-9.
- 9. Vago, A.R., et al., *Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs.* Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1805-9.
- 10. Zingales, B., et al., *The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications.* Infect Genet Evol, 2012. **12**(2): p. 240-53.
- 11. Berná, L., et al., *Biology of the Trypanosoma cruzi Genome*, IntechOpen, Editor. 2019.
- 12. Kollien, A.H. and G.A. Schaub, *The development of Trypanosoma cruzi in triatominae*. Parasitol Today, 2000. **16**(9): p. 381-7.
- 13. Parodi-Talice, A., et al., *Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing Trypanosoma cruzi metacyclogenesis.* J Mass Spectrom, 2007. **42**(11): p. 1422-32.
- 14. 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.
- 15. Giddings, O.K., et al., *Anatomical route of invasion and protective mucosal immunity in Trypanosoma cruzi conjunctival infection.* Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5549-60.
- 16. 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 Infect, 2004. **6**(5): p. 460-7.
- 17. Mortara, R.A., *Trypanosoma cruzi: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells.* Exp Parasitol, 1991. **73**(1): p. 1-14.
- 18. Tyler, K.M. and D.M. Engman, *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited*. Int J Parasitol, 2001. **31**(5-6): p. 472-81.
- 19. Nagajyothi, F., et al., *Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease*. Cell Microbiol, 2012. **14**(5): p. 634-43.
- 20. Chagas, C., Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1909.

21.	Coura, J.R., <i>The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissionsa comprehensive review.</i> Mem Inst Oswaldo Cruz, 2015. <b>110</b> (3): p. 277-82.
22.	Coura, J.R. and P.A. Vinas, <i>Chagas disease: a new worldwide challenge.</i> Nature, 2010. <b>465</b> (7301): p. S6-7.
23.	Dumonteil, E., et al., <i>Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects.</i> Expert Rev Vaccines, 2012. <b>11</b> (9): p. 1043-55.
24.	Bonney, K.M., <i>Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat?</i> Parasite, 2014. <b>21</b> : p. 11.
25.	Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, <i>Chagas disease</i> . Lancet, 2010. <b>375</b> (9723): p. 1388-402.
26.	Shikanai-Yasuda, M.A. and N.B. Carvalho, <i>Oral transmission of Chagas disease</i> . Clin Infect Dis, 2012. <b>54</b> (6): p. 845-52.
27.	Fernandes, M.C. and N.W. Andrews, <i>Host cell invasion by Trypanosoma cruzi: a unique strategy that promotes persistence.</i> FEMS Microbiol Rev, 2012. <b>36</b> (3): p. 734-47.
28.	Lewis, M.D. and J.M. Kelly, Putting Infection Dynamics at the Heart of Chagas Disease. Trends Parasitol, 2016. <b>32</b> (11): p. 899-911.
29.	Castro, J.A. and E.G. Diaz de Toranzo, <i>Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease)</i> . Biomed Environ Sci, 1988. <b>1</b> (1): p. 19-33.
30.	de Castro, A.M., et al., <i>Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic Trypanosoma cruzi infection.</i> Parasitol Res, 2006. <b>99</b> (4): p. 379-83.
31.	Guedes, P.M., et al., <i>Current status of Chagas disease chemotherapy</i> . Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. <b>9</b> (5): p. 609-20.
32.	Jackson, Y., et al., <i>Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease.</i> Clin Infect Dis, 2010. <b>51</b> (10): p. e69-75.
33.	Yun, O., et al., Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Medecins Sans Frontieres. PLoS Negl Trop Dis, 2009. <b>3</b> (7): p. e488.
34.	Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J. Marcondes de Rezende, <i>American trypanosomiasis</i> <i>(Chagas disease).</i> Infect Dis Clin North Am, 2012. <b>26</b> (2): p. 275-91.
35.	Morillo, C.A., et al., <i>Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas'</i> <i>Cardiomyopathy</i> . N Engl J Med, 2015. <b>373</b> (14): p. 1295-306.
36.	Bocchi EA, F.A., <i>The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by Trypanosoma cruzi</i> . 2001: First Guidelines Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology.
37.	Rassi A Jr, R.S., Rassi A., Sudden death in Chagas' disease 2001, Arquivos brasileiros de cardiologia.
38.	Tanowitz, H.B., et al., <i>Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease</i> (Chagas disease). Prog Cardiovasc Dis, 2009. <b>51</b> (6): p. 524-39.
39.	Morris, S.A., et al., <i>Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease</i> . Circulation, 1990. <b>82</b> (6): p. 1900-9.
40.	Rossi, M.A. and R.B. Bestetti, <i>The challenge of chagasic cardiomyopathy. The</i> pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. Cardiology, 1995. <b>86</b> (1): p. 1-7.
41.	Rossi, M.A. and S.G. Ramos, <i>Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease.</i> Am Heart J, 1996. <b>132</b> (1 Pt 1): p. 207-10.
42.	Pereira Barretto, A.C., et al., <i>Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease</i> . Am Heart J, 1986. <b>111</b> (2): p. 307-12.

43.	Machado, F.S., et al., <i>Chagas heart disease: report on recent developments.</i> Cardiol Rev, 2012. <b>20</b> (2): p. 53-65.
44.	Higuchi, Y., et al., <i>The small GTP-binding protein Rac1 induces cardiac myocyte</i> hypertrophy through the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and nuclear factor-kappa B. J Biol Chem, 2003. <b>278</b> (23): p. 20770-7.
45.	Bocchi, E.A., et al., <i>Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to</i> Cardiomyopathy Treatment. J Am Coll Cardiol, 2017. <b>70</b> (12): p. 1510-1524.
46.	Bellotti, G., et al., <i>In vivo detection of Trypanosoma cruzi antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease.</i> Am Heart J, 1996. <b>131</b> (2): p. 301-7.
47.	Tarleton, R.L., L. Zhang, and M.O. Downs, "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. <b>94</b> (8): p. 3932-7.
48.	Tarleton, R.L. and L. Zhang, <i>Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?</i> Parasitol Today, 1999. <b>15</b> (3): p. 94-9.
49.	Zhang, L. and R.L. Tarleton, <i>Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease</i> . J Infect Dis, 1999. <b>180</b> (2): p. 480-6.
50.	Cunha-Neto, E., et al., <i>Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry.</i> Autoimmunity, 2006. <b>39</b> (1): p. 41-54.
51.	Velasco, A. and C.A. Morillo, <i>Chagas heart disease: A contemporary review</i> . J Nucl Cardiol, 2018.
52.	Neubauer, S., <i>The failing heartan engine out of fuel.</i> N Engl J Med, 2007. <b>356</b> (11): p. 1140-51.
53.	Stanley, W.C., F.A. Recchia, and G.D. Lopaschuk, <i>Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart.</i> Physiol Rev, 2005. <b>85</b> (3): p. 1093-129.
54.	Lesnefsky, E.J., et al., <i>Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-</i> <i>reperfusion, aging, and heart failure.</i> J Mol Cell Cardiol, 2001. <b>33</b> (6): p. 1065-89.
55.	Manque, P.A., et al., <i>Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes</i> . Infect Immun, 2011. <b>79</b> (5): p. 1855-62.
56.	Goldenberg, R.C., et al., <i>Transcriptomic alterations in Trypanosoma cruzi-infected cardiac myocytes</i> . Microbes Infect, 2009. <b>11</b> (14-15): p. 1140-9.
57.	Mukherjee, S., et al., <i>Alterations in myocardial gene expression associated with experimental Trypanosoma cruzi infection</i> . Genomics, 2008. <b>91</b> (5): p. 423-32.
58.	Garg, N., V.L. Popov, and J. Papaconstantinou, <i>Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in Trypanosoma cruzi-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development</i> . Biochim Biophys Acta, 2003. <b>1638</b> (2): p. 106-20.
59.	Estrada, D., et al., <i>Cardiomyocyte diffusible redox mediators control Trypanosoma cruz infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase.</i> Biochem J, 2018. <b>475</b> (7): p. 1235-1251.
60.	Vyatkina, G., et al., <i>Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development</i> . Biochim Biophys Acta, 2004. <b>1689</b> (2): p. 16273.
61.	Gupta, S., et al., <i>Trypanosoma cruzi infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes</i> . Free Radic Biol Med, 2009. <b>47</b> (10): p. 1414-21.
62.	Udoko, A.N., et al., <i>Early Regulation of Profibrotic Genes in Primary Human Cardiac</i> <i>Myocytes by Trypanosoma cruzi</i> . PLoS Negl Trop Dis, 2016. <b>10</b> (1): p. e0003747.
62	Currhe Note E stal Candias sons surression profiling provides suidenes for

63. Cunha-Neto, E., et al., *Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy.* Am J Pathol, 2005. **167**(2): p. 305-13.
- 64. Yang, W., et al., *Microarray profiling of long non-coding RNA (IncRNA) associated with hypertrophic cardiomyopathy.* BMC Cardiovasc Disord, 2015. **15**: p. 62.
- 65. Teixeira, P.C., et al., *Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy.* PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(6): p. e1205.
- 66. Teixeira, T., et al., *Differential protein expression profiles in hearts of chronic Chagas disease cardiomyopathy or idiopathic dilated cardiomiopathy.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2003. **45**.
- 67. Silva, M.C., et al., Canonical PI3Kgamma signaling in myeloid cells restricts Trypanosoma cruzi infection and dampens chagasic myocarditis. Nat Commun, 2018.
   9(1): p. 1513.
- 68. Luss, H., et al., *Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiac myocytes in vivo and following cytokine exposure in vitro.* J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(9): p. 2015-29.
- 69. Wang, D., et al., Response of the neonatal rat cardiomyocyte in culture to energy depletion: effects of cytokines, nitric oxide, and heat shock proteins. Lab Invest, 1996.
   75(6): p. 809-18.
- 70. Jhanwar-Uniyal, M., et al., *Diverse signaling mechanisms of mTOR complexes: mTORC1 and mTORC2 in forming a formidable relationship.* Adv Biol Regul, 2019. **72**: p. 51-62.
- 71. Morita, M., et al., *mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation*. Cell Cycle, 2015. **14**(4): p. 473-80.
- 72. Morita, M., et al., *mTORC1 Controls Mitochondrial Activity and Biogenesis through* 4EBP-Dependent Translational Regulation. Cell Metab, 2013. **18**(5): p. 698-711.
- 73. 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.
- 74. Woolsey, A.M., et al., *Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3611-22.
- 75. Nagajyothi, F., et al., *Trypanosoma cruzi infection of cultured adipocytes results in an inflammatory phenotype.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(9): p. 1992-7.
- Wilkowsky, S.E., et al., *Trypanosoma cruzi: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion*. Exp Cell Res, 2001. 264(2): p. 211-8.
- 77. Todorov, A.G., et al., *Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by Trypanosoma cruzi infection.* J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32182-6.
- 78. Caradonna, K.L., et al., *Host metabolism regulates intracellular growth of Trypanosoma cruzi.* Cell Host Microbe, 2013. **13**(1): p. 108-17.
- 79. Rojas Marquez, J.D., et al., *Mammalian Target of Rapamycin Inhibition in Trypanosoma cruzi-Infected Macrophages Leads to an Intracellular Profile That Is Detrimental for Infection.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 313.
- 80. Scheibye-Knudsen, M., et al., *Protecting the mitochondrial powerhouse.* Trends Cell Biol, 2015. **25**(3): p. 158-70.
- 81. Nacarelli, T., A. Azar, and C. Sell, *Mitochondrial stress induces cellular senescence in an mTORC1-dependent manner.* Free Radic Biol Med, 2016. **95**: p. 133-54.
- 82. Kuilman, T., et al., *The essence of senescence*. Genes Dev, 2010. **24**(22): p. 2463-79.
- 83. 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.
- 84. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.

85.	Salama, R., et al., <i>Cellular senescence and its effector programs</i> . Genes Dev, 2014. <b>28</b> (2): p. 99-114.
86.	Acosta, J.C., et al., <i>Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence</i> . Cell, 2008. <b>133</b> (6): p. 1006-18.
87.	Coppe, J.P., et al., <i>Senescence-associated secretory phenotypes reveal</i> <i>cellnonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor.</i> PLoS Biol, 2008. <b>6</b> (12): p. 2853-68.
88.	Kuilman, T., et al., Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. Cell, 2008. <b>133</b> (6): p. 1019-31.
89.	Perez-Mancera, P.A., A.R. Young, and M. Narita, <i>Inside and out: the activities of senescence in cancer.</i> Nat Rev Cancer, 2014. <b>14</b> (8): p. 547-58.
90.	Munoz-Espin, D. and M. Serrano, <i>Cellular senescence: from physiology to pathology.</i> Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. <b>15</b> (7): p. 482-96.
91.	Narita, M., et al., <i>Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence</i> . Cell, 2003. <b>113</b> (6): p. 703-16.
92.	Rai, T.S. and P.D. Adams, <i>Lessons from senescence: chromatin maintenance in nonproliferating cells.</i> Biochim Biophys Acta, 2013. <b>1819</b> (3-4): p. 322-31.
93.	Lee, B.Y., et al., <i>Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal betagalactosidase.</i> Aging Cell, 2006. <b>5</b> (2): p. 187-95.
94.	Albareda, M.C., et al., Chronic human infection with Trypanosoma cruzi drives CD4+ T cells to immune senescence. J Immunol, 2009. <b>183</b> (6): p. 4103-8.
95.	Albareda, M.C., et al., <i>Assessment of CD8(+) T cell differentiation in Trypanosoma</i> <i>cruziinfected children</i> . Am J Trop Med Hyg, 2010. <b>82</b> (5): p. 861-4.
96.	Guimaraes-Pinto, K., et al., <i>Trypanosoma cruzi Infection Induces Cellular Stress</i> <i>Response and Senescence-Like Phenotype in Murine Fibroblasts.</i> Front Immunol, 2018. <b>9</b> : p. 1569.
97.	Bonney, K.M. and D.M. Engman, <i>Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many?</i> Curr Mol Med, 2008. <b>8</b> (6): p. 510-8.
98.	Machado, F.S., et al., <i>Pathogenesis of Chagas disease: time to move on.</i> Front Biosci (Elite Ed), 2012. <b>4</b> : p. 1743-58.
99.	Acevedo, G.R., M.C. Girard, and K.A. Gomez, <i>The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease.</i> Front Immunol, 2018. <b>9</b> : p. 1929.
100.	Rodrigues, M.M., A.C. Oliveira, and M. Bellio, <i>The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development</i> . J Parasitol Res, 2012. <b>2012</b> : p. 507874.
101.	Kawai, T. and S. Akira, <i>The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.</i> Nat Immunol, 2010. <b>11</b> (5): p. 373-84.
102.	Medzhitov, R., <i>Origin and physiological roles of inflammation</i> . Nature, 2008. <b>454</b> (7203): p. 428-35.
103.	Yu, L., L. Wang, and S. Chen, <i>Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance.</i> J Cell Mol Med, 2010. <b>14</b> (11): p. 2592-603.
104.	Piccinini, A.M. and K.S. Midwood, <i>DAMPening inflammation by modulating TLR signalling</i> . Mediators Inflamm, 2010. <b>2010</b> .
105.	Akira, S. and K. Takeda, <i>Toll-like receptor signalling.</i> Nat Rev Immunol, 2004. <b>4</b> (7): p. 499-511.
106.	Akashi-Takamura, S. and K. Miyake, <i>TLR accessory molecules.</i> Curr Opin Immunol, 2008. <b>20</b> (4): p. 420-5.
107.	Perkins, N.D., <i>Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function.</i> Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. <b>8</b> (1): p. 49-62.
108.	Liu, T., et al., <i>NF-kappaB signaling in inflammation</i> . Signal Transduct Target Ther, 2017.

109.	De Andrea, M., et al., The interferon system: an overview. Eur J Paediatr Neurol, 2002.
	6 Suppl A: p. A41-6; discussion A55-8.
110.	Davies, L.C., et al., Tissue-resident macrophages. Nat Immunol, 2013. 14(10): p. 98695.
111.	Murray, P.J. and T.A. Wynn, <i>Protective and pathogenic functions of macrophage subsets</i> . Nat Rev Immunol, 2011. <b>11</b> (11): p. 723-37.
112.	Troutman, T.D., et al., <i>Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt.</i> Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. <b>109</b> (1): p. 273-8.
113.	Covarrubias, A.J., H.I. Aksoylar, and T. Horng, <i>Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling</i> . Semin Immunol, 2015. <b>27</b> (4): p. 286-96.
114.	Koga, R., et al., <i>TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> . J Immunol, 2006. <b>177</b> (10): p. 7059-66.
115.	Campos, M.A., et al., Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol, 2001. <b>167</b> (1): p. 416-23.
116.	Medeiros, M.M., et al., <i>Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and</i> immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from Trypanosoma cruzi. J Leukoc Biol, 2007. <b>82</b> (3): p. 488-96.
117.	Oliveira, A.C., et al., <i>Expression of functional TLR4 confers proinflammatory</i> <i>responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance</i> <i>to infection with T. cruzi.</i> J Immunol, 2004. <b>173</b> (9): p. 5688-96.
118.	Bafica, A., et al., <i>Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for</i> <i>MyD88dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection.</i> J Immunol, 2006. <b>177</b> (6): p. 3515-9.
119.	Shoda, L.K., et al., DNA from protozoan parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T. brucei is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. Infect Immun, 2001. <b>69</b> (4): p. 2162-71.
120.	Bartholomeu, D.C., et al., <i>Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi</i> . J Immunol, 2008. <b>181</b> (2): p. 1333-44.
121.	Caetano, B.C., et al., <i>Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with Trypanosoma cruzi</i> . J Immunol, 2011. <b>187</b> (4): p. 1903-11.
122.	Padilla, A.M., J.M. Bustamante, and R.L. Tarleton, <i>CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection.</i> Curr Opin Immunol, 2009. <b>21</b> (4): p. 385-90.
123.	Zumla, A., et al., <i>Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects.</i> Lancet Infect Dis, 2016. <b>16</b> (4): p. e47-63.
124.	Smith, C.M., et al., <i>Red cells from ferrochelatase-deficient erythropoietic protoporphyria patients are resistant to growth of malarial parasites.</i> Blood, 2015. <b>125</b> (3): p. 534-41.
125.	Kwiatkowski, D., et al. <i>, Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria.</i> Q J Med, 1993. <b>86</b> (2): p. 91-8.
126.	Bucheton, B., A. MacLeod, and V. Jamonneau, <i>Human host determinants influencing the outcome of Trypanosoma brucei gambiense infections</i> . Parasite Immunol, 2011. <b>33</b> (8): p. 438-47.
127.	Collier, M.A., et al., <i>Delivery of host cell-directed therapeutics for intracellular pathogen clearance.</i> Expert Rev Anti Infect Ther, 2013. <b>11</b> (11): p. 1225-35.
128.	Khadir, F., et al., Antileishmanial effect of rapamycin as an alternative approach to control Leishmania tropica infection. Vet Parasitol, 2019. <b>276</b> : p. 108976.
129.	Singhal, A., et al., <i>Metformin as adjunct antituberculosis therapy</i> . Sci Transl Med, 2014. <b>6</b> (263): p. 263ra159.

130.	Morelon, E., et al., <i>Characteristics of sirolimus-associated interstitial pneumonitis in renal transplant patients.</i> Transplantation, 2001. <b>72</b> (5): p. 787-90.
131.	Vignot, S., et al., <i>mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives</i> . Ann Oncol, 2005. <b>16</b> (4): p. 525-37.
132.	Fontaine, E., <i>Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts,</i> Uncertainties, and Consequences. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. <b>9</b> : p. 753.
133.	Brima, W., et al., <i>The brighter (and evolutionarily older) face of the metabolic syndrome: evidence from Trypanosoma cruzi infection in CD-1 mice.</i> Diabetes Metab Res Rev, 2015. <b>31</b> (4): p. 346-359.
134.	Shoshan, M.C., <i>Potentiation of anti-cancer treatment by modulators of energy metabolism</i> . Curr Pharm Biotechnol, 2013. <b>14</b> (3): p. 313-30.
135.	Simoes-Silva, M.R., et al., <i>Repurposing strategies for Chagas disease therapy: the effect of imatinib and derivatives against Trypanosoma cruzi.</i> Parasitology, 2019. <b>146</b> (8): p. 1006-1012.
136.	Doherty, J.R. and J.L. Cleveland, <i>Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics.</i> J Clin Invest, 2013. <b>123</b> (9): p. 3685-92.
137.	Fiorillo, M., et al., <i>Repurposing atovaquone: targeting mitochondrial complex III and OXPHOS to eradicate cancer stem cells.</i> Oncotarget, 2016. <b>7</b> (23): p. 34084-99.
138.	modulation of mitochondrial malate dehydrogenase. Sci Transl Med, 2014. <b>6</b> (266): p. 266ra170.
139.	Bost, F., et al., <i>Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy?</i> Oncogenesis, 2016. <b>5</b> : p. e188.
140.	Silwal, P., et al., <i>AMP-Activated Protein Kinase and Host Defense against Infection</i> . Int J Mol Sci, 2018. <b>19</b> (11).
141.	Nagajyothi, F., et al., <i>Curcumin treatment provides protection against Trypanosoma cruzi infection.</i> Parasitol Res, 2012. <b>110</b> (6): p. 2491-9.
142.	Barrias, E.S., T.M. de Carvalho, and W. De Souza, <i>Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation.</i> Front Immunol, 2013. <b>4</b> : p. 186.
143.	Yoshida, N., <i>Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi</i> . An Acad Bras Cienc, 2006. <b>78</b> (1): p. 87-111.
144.	Cabral, M.M., et al., <i>Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against Trypanosoma cruzi</i> . Exp Parasitol, 2010. <b>124</b> (3): p. 319-24.
145.	De Pablos, L.M. and A. Osuna, <i>Multigene families in Trypanosoma cruzi and their role in infectivity</i> . Infect Immun, 2012. <b>80</b> (7): p. 2258-64.
146.	Cross, G.A. and G.B. Takle, <i>The surface trans-sialidase family of Trypanosoma cruzi.</i> Annu Rev Microbiol, 1993. <b>47</b> : p. 385-411.
147.	Schenkman, S., et al., <i>Structural and functional properties of Trypanosoma</i> <i>transsialidase.</i> Annu Rev Microbiol, 1994. <b>48</b> : p. 499-523.
148.	Schenkman, S. and D. Eichinger, <i>Trypanosoma cruzi trans-sialidase and cell invasion.</i> Parasitol Today, 1993. <b>9</b> (6): p. 218-22.
149.	Frevert, U., S. Schenkman, and V. Nussenzweig, <i>Stage-specific expression and intracellular shedding of the cell surface trans-sialidase of Trypanosoma cruzi</i> . Infect Immun, 1992. <b>60</b> (6): p. 2349-60.
150.	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. <b>11</b> (4): p. 1487-98.

- 151. 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. 725-34. 152. 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. Buscaglia, C.A., et al., Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat 153. diversity. Nat Rev Microbiol, 2006. 4(3): p. 229-36. 154. Bartholomeu, D.C., et al., Genomic organization and expression profile of the mucinassociated surface protein (masp) family of the human pathogen Trypanosoma *cruzi.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(10): p. 3407-17. 155. 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. 156. 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. 157. Songthamwat, D., et al., Structure and expression of three gp82 gene subfamilies of *Trypanosoma cruzi.* Parasitol Int, 2007. **56**(4): p. 273-80. 158. 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. 159. Cortez, M., et al., Trypanosoma cruzi surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. Microbes Infect, 2006. 8(1): p. 3644. 160. 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. 161. Docampo, R. and S.N. Moreno, The role of Ca2+ in the process of cell invasion by intracellular parasites. Parasitol Today, 1996. 12(2): p. 61-5. 162. Ming, M., M.E. Ewen, and M.E. Pereira, Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. Cell, 1995. 82(2): p. 287-96. 163. Waghabi, M.C., et al., Pharmacological inhibition of transforming growth factor beta signaling decreases infection and prevents heart damage in acute Chagas' disease. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(11): p. 4694-701. 164. Kleshchenko, Y.Y., et al., Human galectin-3 promotes Trypanosoma cruzi adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. Infect Immun, 2004. 72(11): p. 6717-21. Claser, C., et al., Silencing cytokeratin 18 gene inhibits intracellular replication 165. of Trypanosoma cruzi in HeLa cells but not binding and invasion of trypanosomes. BMC Cell Biol, 2008. 9: p. 68. 166. Nagajyothi, F., et al., Trypanosoma cruzi utilizes the host low density lipoprotein *receptor in invasion*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(2): p. e953. 167. Simmons, K.J., et al., Stable RNA interference of host thrombospondin-1 blocks *Trypanosoma cruzi infection.* FEBS Lett, 2006. **580**(9): p. 2365-70. 168. Nde, P.N., et al., Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks Trypanosoma cruzi *infection.* Infect Immun, 2006. **74**(3): p. 1643-8. 169. Caradonna, K.L. and B.A. Burleigh, Mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma
- cruzi. Adv Parasitol, 2011. 76: p. 33-61.
  170. Epting, C.L., B.M. Coates, and D.M. Engman, *Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol, 2010. 126(3): p. 283-91.
- 171. Vieira, M., et al., *Cellular signaling during the macrophage invasion by Trypanosoma cruzi.* Histochem Cell Biol, 2002. **118**(6): p. 491-500.

- 172. Burleigh, B.A., *Host cell signaling and Trypanosoma cruzi invasion: do all roads lead to lysosomes?* Sci STKE, 2005. **2005**(293): p. pe36.
- Ferreira, B.L., et al., *Trypanosoma cruzi extracellular amastigotes selectively trigger the PI3K/Akt and Erk pathways during HeLa cell invasion*. Microbes Infect, 2019. **21**(10): p. 485-489.
- 174. 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.
- 175. Ley, V., et al., *The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments.* J Exp Med, 1990. **171**(2): p. 401-13.
- 176. de Souza, W., T.M. de Carvalho, and E.S. Barrias, *Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction.* Int J Cell Biol, 2010. **2010**.
- 177. 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.
- 178. Li, Y., et al., *Transcriptome Remodeling in Trypanosoma cruzi and Human Cells during Intracellular Infection.* PLoS Pathog, 2016. **12**(4): p. e1005511.
- 179. Chiribao, M.L., et al., *Early Trypanosoma cruzi infection reprograms human epithelial cells.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 439501.
- Adesse, D., et al., *Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of Trypanosoma cruzi.* Am J Trop Med Hyg, 2010.
   82(5): p. 846-54.
- 181. 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.
- 182. Castillo, C., et al., *Host-parasite interaction: changes in human placental gene expression induced by Trypanosoma cruzi.* Parasit Vectors, 2018. **11**(1): p. 479.
- 183. Belew, A.T., et al., *Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent Trypanosoma cruzi underlines the role of surface proteins during infection*. PLoS Pathog, 2017. **13**(12): p. e1006767.
- 184. 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.
- 185. M.G.Libisch, et.al., *Early Trypanosoma cruzi Infection Triggers mTORC1-Mediated Respiration Increase and Mitochondrial Biogenesis in Human Primary Cardiomyocytes.* Front.Microbiology, 2018. **9:1889**.
- 186. Contreras, V.T., et al., *In vitro differentiation of Trypanosoma cruzi under chemically defined conditions*. Mol Biochem Parasitol, 1985. **16**(3): p. 315-27.
- 187. Pathan, M., et al., *FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool.* Proteomics, 2015. **15**(15): p. 2597-2601.
- 188. Kiełbasa, S.M., et al., *TransFind—predicting transcriptional regulators for gene sets*. Nucleic acids research, 2010. **38**(suppl\_2): p. W275-W280.
- 189. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
- 190. Faral-Tello, P., et al., *Imidazolium compounds are active against all stages of Trypanosoma cruzi.* Int J Antimicrob Agents, 2014. **43**(3): p. 262-8.
- 191. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.* Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
- 192. Itahana, K., Y. Itahana, and G.P. Dimri, *Colorimetric detection of senescence-associated beta galactosidase.* Methods Mol Biol, 2013. **965**: p. 143-56.

193.	Liu, X. and G. Hajnoczky, Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. Cell Death Differ, 2011. <b>18</b> (10): p. 1561-72.
194.	Ahmad, T., et al., <i>Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state.</i> Cell Death Dis, 2013. <b>4</b> : p. e461.
195.	Fernandez-Marcos, P.J. and J. Auwerx, <i>Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis</i> . Am J Clin Nutr, 2011. <b>93</b> (4): p. 884S-90.
196.	Laplante, M. and D.M. Sabatini, <i>mTOR signaling at a glance</i> . J Cell Sci, 2009. <b>122</b> (Pt 20): p. 3589-94.
197.	Cario, E. and D.K. Podolsky, <i>Toll-like receptor signaling and its relevance to intestinal inflammation.</i> Ann N Y Acad Sci, 2006. <b>1072</b> : p. 332-8.
198.	Cario, E. and D.K. Podolsky, <i>Intestinal epithelial TOLLerance versus inTOLLerance of commensals</i> . Mol Immunol, 2005. <b>42</b> (8): p. 887-93.
199.	Abreu, M.T., M. Fukata, and M. Arditi, <i>TLR signaling in the gut in health and disease</i> . J Immunol, 2005. <b>174</b> (8): p. 4453-60.
200.	Fritz, J.H., et al., <i>Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat.</i> Trends Immunol, 2008. <b>29</b> (1): p. 41-9.
201.	Parkin, J. and B. Cohen, <i>An overview of the immune system</i> . Lancet, 2001. <b>357</b> (9270): p. 1777-89.
202.	Bastos, K.R., et al., <i>What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells?</i> Microbes Infect, 2004. <b>6</b> (6): p. 630-6.
203.	Zhang, Y. and H. Wang, <i>Integrin signalling and function in immune cells</i> . Immunology, 2012. <b>135</b> (4): p. 268-75.
204.	Henson, E.S. and S.B. Gibson, <i>Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy.</i> Cell Signal, 2006. <b>18</b> (12): p. 2089-97.
205.	Zhang, H., et al., <i>PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR</i> . J Clin Invest, 2007. <b>117</b> (3): p. 730-8.
206.	Lee, S.Y., C. Jang, and K.A. Lee, <i>Polo-like kinases (plks), a key regulator of cell cycle and new potential target for cancer therapy.</i> Dev Reprod, 2014. <b>18</b> (1): p. 65-71.
207.	Martinez, F.O. and S. Gordon, <i>The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment</i> . F1000Prime Rep, 2014. <b>6</b> : p. 13.
208.	Yamamoto, Y. and R.B. Gaynor <i>, IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway.</i> Trends Biochem Sci, 2004. <b>29</b> (2): p. 72-9.
209.	Andreakos, E., et al., <i>Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP.</i> Blood, 2004. <b>103</b> (6): p. 2229-37.
210.	Rodier, F. and J. Campisi, <i>Four faces of cellular senescence.</i> J Cell Biol, 2011. <b>192</b> (4): p. 547-56.
211.	Rovillain, E., et al., Activation of nuclear factor-kappa B signalling promotes cellular senescence. Oncogene, 2011. <b>30</b> (20): p. 2356-66.
212.	Hawkins, E.D., et al., <i>Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data</i> . Nat Protoc, 2007. <b>2</b> (9): p. 2057-67.
213.	Coppe, J.P., et al., <i>The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression</i> . Annu Rev Pathol, 2010. <b>5</b> : p. 99-118.
214.	Rodier, F., et al., <i>Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion.</i> Nat Cell Biol, 2009. <b>11</b> (8): p. 973-9.
215.	Freund, A., et al., <i>Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences.</i> Trends Mol Med, 2010. <b>16</b> (5): p. 238-46.

- 216. Goes, G.R., et al., *Trypanosoma cruzi Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages.* PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(4): p. e0004555.
- 217. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
- 218. Rassi, A., Jr., J.A.N. Marin, and A. Rassi, *Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial.* Mem Inst Oswaldo Cruz, 2017. **112**(3): p. 224-235.
- Mukherjee, S., et al., *Trypanosoma cruzi infection activates extracellular* signalregulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5274-82.
- 220. Higuchi, M.L., et al., *The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies.* Clin Cardiol, 1987. **10**(11): p. 665-70.
- 221. Higuchi, M.D., *Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions.* Sao Paulo Med J, 1995. **113**(2): p. 821-5.
- 222. Miura, S., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinases prevents cardiac hypertrophy induced by beta-adrenergic stimulation in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **42**(2): p. 174-81.
- Shah-Simpson, S., et al., Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular Trypanosoma cruzi amastigotes. PLoS Pathog, 2017.
   13(11): p. e1006747.
- 224. Koo, S.J., et al., *Macrophages Promote Oxidative Metabolism To Drive Nitric Oxide Generation in Response to Trypanosoma cruzi.* Infect Immun, 2016. **84**(12): p. 35273541.
- 225. Demetrius, L., *Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans.* EMBO Rep, 2005. **6 Spec No**: p. S39-44.
- 226. Demetrius, L., *Caloric restriction, metabolic rate, and entropy.* J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004. **59**(9): p. B902-15.
- 227. Wan, X., et al., *Defects of mtDNA replication impaired mitochondrial biogenesis during Trypanosoma cruzi infection in human cardiomyocytes and chagasic patients: the role of Nrf1/2 and antioxidant response.* J Am Heart Assoc, 2012. **1**(6): p. e003855.
- 228. Kosloski, L.M., et al., *Purification of cardiac myocytes from human heart biopsies for gene expression analysis.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. H1163-9.
- 229. Sanchis-Gomar, F., et al., *Mitochondrial biogenesis in health and disease. Molecular and therapeutic approaches.* Curr Pharm Des, 2014. **20**(35): p. 5619-33.
- 230. Shi, L., et al., Infection with Mycobacterium tuberculosis induces the Warburg effect in mouse lungs. Sci Rep, 2015. **5**: p. 18176.
- 231. Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini, *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 21-35.
- 232. Roux, P.P. and I. Topisirovic, *Regulation of mRNA translation by signaling pathways*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(11).
- 233. Nandagopal, N. and P.P. Roux, *Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway*. Translation (Austin), 2015. **3**(1): p. e983402.
- 234. Lee, H.C., et al., *Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells.* Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 425-32.
- 235. Guo, C., et al., *Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases.* Neural Regen Res, 2013. **8**(21): p. 2003-14.
- 236. Sanchez-Valdez, F.J., et al., *Spontaneous dormancy protects Trypanosoma cruzi during extended drug exposure.* Elife, 2018. **7**.

237.	Jayachandran, R., N. Scherr, and J. Pieters, <i>Elimination of intracellularly residing</i> <i>Mycobacterium tuberculosis through targeting of host and bacterial signaling</i> <i>mechanisms.</i> Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. <b>10</b> (9): p. 1007-22.
238.	Tomioka, H., <i>New approaches to tuberculosisnovel drugs based on drug targets related to toll-like receptors in macrophages.</i> Curr Pharm Des, 2014. <b>20</b> (27): p. 440417.
239.	Cortez, C., F. Real, and N. Yoshida, <i>Lysosome biogenesis/scattering increases host cell susceptibility to invasion by Trypanosoma cruzi metacyclic forms and resistance to tissue culture trypomastigotes.</i> Cell Microbiol, 2016. <b>18</b> (5): p. 748-60.
240.	Martins, R.M., et al., <i>Starvation and rapamycin differentially regulate host cell lysosome exocytosis and invasion by Trypanosoma cruzi metacyclic forms.</i> Cell Microbiol, 2011. <b>13</b> (7): p. 943-54.
241.	Oliveira, A.E.R., et al., <i>Close encounters between Trypanosoma cruzi and the host mammalian cell: Lessons from genome-wide expression studies.</i> Genomics, 2019.
242.	Swierzy, I.J., et al., Divergent co-transcriptomes of different host cells infected with Toxoplasma gondii reveal cell type-specific host-parasite interactions. Sci Rep, 2017. <b>7</b> (1): p. 7229.
243.	Iwasaki, A. and R. Medzhitov, <i>Toll-like receptor control of the adaptive immune responses</i> . Nat Immunol, 2004. <b>5</b> (10): p. 987-95.
244.	Matzinger, P., <i>The danger model: a renewed sense of self.</i> Science, 2002. <b>296</b> (5566): p. 301-5.
245.	Jordana, M., et al., <i>Immune-inflammatory functions of fibroblasts</i> . European Respiratory Journal, 1994. <b>7</b> (12): p. 2212-2222.
246.	Zhang, S., et al., <i>Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines.</i> PLoS Negl Trop Dis, 2010. <b>4</b> (3): p. e648.
247.	Ty, M.C., et al., <i>Immuno-metabolic profile of human macrophages after Leishmania and Trypanosoma cruzi infection</i> . PLoS One, 2019. <b>14</b> (12): p. e0225588.
248.	Milei, J., et al., <i>Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy</i> . <i>Immunohistochemical and ultrastructural findings</i> . Cardiology, 1992. <b>80</b> (5-6): p. 42437.
249.	Higuchi Mde, L., et al., <i>Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process.</i> Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1993. <b>423</b> (3): p. 157-60.
250.	Didie, M., et al., <i>Immunological Properties of Murine Parthenogenetic Stem Cell-</i> <i>Derived Cardiomyocytes and Engineered Heart Muscle.</i> Front Immunol, 2017. <b>8</b> : p. 955.
251.	Reis, D.D., et al., <i>Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease</i> . Am J Trop Med Hyg, 1993. <b>49</b> (2): p. 192-200.
252.	Gough, S.C. and M.J. Simmonds, <i>The HLA Region and Autoimmune Disease:</i> Associations and Mechanisms of Action. Curr Genomics, 2007. <b>8</b> (7): p. 453-65.
253.	Gattass, C.R., et al., <i>Do self-heart-reactive T cells expand in Trypanosoma cruzi-immune hosts?</i> Infect Immun, 1988. <b>56</b> (5): p. 1402-5.
254.	Cunha-Neto, E., et al., Autoimmunity. Adv Parasitol, 2011. <b>76</b> : p. 129-52.
255.	Cardillo, F., et al., <i>Immunity and immune modulation in Trypanosoma cruzi infection.</i> Pathog Dis, 2015. <b>73</b> (9): p. ftv082.
256.	Chuenkova, M.V. and M. PereiraPerrin, <i>Trypanosoma cruzi targets Akt in host cells as an intracellular antiapoptotic strategy</i> . Sci Signal, 2009. <b>2</b> (97): p. ra74.
257.	Yamaguchi, H. and H.G. Wang, <i>The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change</i> . Oncogene, 2001. <b>20</b> (53): p. 777986.
258.	Zhou, H., et al., <i>Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level.</i> J Cell Biol, 2000. <b>151</b> (3): p. 483-94.

- 259. de Melo-Jorge, M. and M. PereiraPerrin, *The Chagas' disease parasite Trypanosoma cruzi exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts.* Cell Host Microbe, 2007. **1**(4): p. 251-61.
- 260. Rider, P., et al., *IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation.* J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4835-43.
- 261. Fielding, C.A., et al., *IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 2189-95.
- 262. Griffin, G.K., et al., *IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation*. J Immunol, 2012.
   188(12): p. 6287-99.
- 263. Long, Q., el al., *Modeling of Mitochondrial Donut Formation*. Biophys J, 2015. 109(5): p. 829-9.
- 264. Martinez, J., et al., *Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells.* Biochem J, 2019. 476(17): p. 2463-2486.
- 265. Johndrow, C., et al., *Trypanosoma cruzi infection results in an increase in intracellular cholesterol.* Microbes Infect, 2014. **16**(4): p. 337-44.
- 266. Hissa, B., et al., *Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates Trypanosoma cruzi invasion of host cells.* PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(3): p. e1583.

## **ANEXOS**

## ANEXOS

## Anexo 1.

Artículo: "Early *Trypanosoma cruzi* infection triggers mTORC1-mediated respiration increase and mitochondrial biogenesis in human primary cardiomyocytes".

## Anexo 2.

Manuscrito enviado a Journal of Proteomics: "Host-pathogen transcriptomics: *Trypanosoma cruzi* as a model for studying RNA contamination"

## ADDEDUM

Durante el desarrollo de esta tesis también participé en otros trabajos como parte de colaboraciones con diferentes grupos de investigación. Se detallan a continuación los artículos publicados.

## Artículos publicados en los que colaboré en el período 2015-2020.

Castillo C, Carrillo I, **Libisch G**, Juiz N, Schijman A, Robello C, Kemmerling U. Hostparasite interaction: changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*. Parasit Vectors. 2018 Aug 24;11(1):479. doi: 10.1186/s13071-0182988-0.

García EP, Tiscornia I, **Libisch G**, Trajtenberg F, Bollati-Fogolín M, Rodríguez E, Noya V, Chiale C, Brossard N, Robello C, Santiñaque F, Folle G, Osinaga E, Freire T. MUC5B silencing reduces chemo-resistance of MCF-7 breast tumor cells and impairs maturation of dendritic cells. Int J Oncol. 2016 May;48(5):2113-23. doi: 10.3892/ijo.2016.3434.

Palacios F, Prieto D, Abreu C, Ruiz S, Morande P, Fernández-Calero T, **Libisch G**, Landoni AI, Oppezzo P. Dissecting chronic lymphocytic leukemia microenvironment signals in patients with unmutated disease: microRNA-22 regulates phosphatase and tensin homolog/AKT/FOXO1 pathway in proliferative leukemic cells. Leuk Lymphoma. 2015 May;56(5):1560-5. doi: 10.3109/10428194.2014.990900.

Palacios F, Abreu C, Prieto D, Morande P, Ruiz S, Fernández-Calero T, Naya H, **Libisch G**, Robello C, Landoni AI, Gabus R, Dighiero G, Oppezzo P. Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. Leukemia. 2015 Jan;29(1):115-25. doi: 10.1038/leu.2014.158.

# ANEXO 1





## Early *Trypanosoma cruzi* Infection Triggers mTORC1-Mediated Respiration Increase and Mitochondrial Biogenesis in Human Primary Cardiomyocytes

M. Gabriela Libisch<sup>1</sup>, Paula Faral-Tello<sup>1</sup>, Nisha J. Garg<sup>2</sup>, Rafael Radi<sup>3</sup>, Lucía Piacenza<sup>3</sup> and Carlos Robello<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Host-Pathogen Interactions-UBM, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, <sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, The University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, United States, <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Center for Free Radical and Biomedical Research, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

### **OPEN ACCESS**

### Edited by:

Celio Geraldo Freire-de-Lima, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

## Reviewed by:

M. Victoria Delpino, CONICET Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Argentina Eden Ramalho Ferreira, Federal University of São Paulo, Brazil

> \*Correspondence: Carlos Robello robello@pasteur.edu.uy

#### Specialty section:

This article was submitted to Microbial Immunology, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 15 May 2018 Accepted: 27 July 2018 Published: 16 August 2018

#### Citation:

Libisch MG, Faral-Tello P, Garg NJ, Radi R, Piacenza L and Robello C (2018) Early Trypanosoma cruzi Infection Triggers mTORC1-Mediated Respiration Increase and Mitochondrial Biogenesis in Human Primary Cardiomyocytes. Front. Microbiol. 9:1889. doi: 10.3389/fmicb.2018.01889 Chagasic chronic cardiomyopathy is one of the most frequent and severe manifestations of Chagas disease, caused by the parasite Trypanosoma cruzi. The pathogenic and biochemical mechanisms responsible for cardiac lesions remain not completely understood, although it is clear that hypertrophy and subsequent heart dilatation is in part caused by the direct infection of cardiomyocytes. In this work, we evaluated the initial response of human cardiomyocytes to T. cruzi infection by transcriptomic profiling. Immediately after infection, cardiomyocytes dramatically change their gene expression patterns, up regulating most of the genes encoding for respiratory chain, oxidative phosphorylation and protein synthesis. We found that these changes correlate with an increase in basal and maximal respiration, as well as in spare respiratory capacity, which is accompanied by mitochondrial biogenesis  $pgc-1\alpha$  independent. We also demonstrate that these changes are mediated by mTORC1 and reversed by rapamycin, resembling the molecular mechanisms described for the non-chagasic hypertrophic cardiomyopathy. The results of the present work identify that early during infection, the activation of mTORC1, mitochondrial biogenesis and improvement in oxidative phosphorylation are key biochemical changes that provide new insights into the host response to parasite infection and the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. The finding that this phenotype can be reversed opens a new perspective in the treatment of Chagas disease, through the identification of host targets, and the use of combined parasite and host targeted therapies, in order to prevent chagasic cardiomyopathy.

Keywords: Chagas disease, chronic chagasic cardiopathy, host-pathogen, early response to infection, mitochondrial function

## INTRODUCTION

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, remains a major public health problem in Latin America (Bonney, 2014) and more recently has emerged in historically non-endemic regions such as the United States, Canada, Western Europe, Japan, and Australia, due to widespread immigration (Coura and Vinas, 2010; Dumonteil et al., 2012; Bonney, 2014).

The parasite penetrates the host through a skin lesion, by contact with mucous tissue, or by ingestion, vertical transmission or transfusion (Coura and Vinas, 2010; Coura, 2015; Meymandi et al., 2017), and is capable of infecting different types of cells, including epithelial and smooth muscle cells, fibroblasts, macrophages, and cardiomyocytes (Fernandes and Andrews, 2012). Clinically, after acute phase that usually resolves spontaneously in 2-4 months, patients remain chronically infected if untreated (Dias et al., 1956; Rassi et al., 2010), and about 30% of them develop chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) (Fernandes and Andrews, 2012; Lewis and Kelly, 2016), where the apical aneurysm of the left ventricle constitutes the hallmark of the disease (Matta Guedes et al., 2012; Perez-Molina et al., 2015). At the molecular level, the pathogenesis of CCC remains unclear, since it is a multi-factorial disease where both the direct effect of the parasite and the host immune responses contribute to the progressive cardiac damage. In the initial stages of the infection, the parasite-endothelial interactions are among the first to occur (Tanowitz et al., 2009), and it has been proposed to be responsible for T. cruzi induced vasculitis (Morris et al., 1990; Rossi and Bestetti, 1995; Rossi and Ramos, 1996), whereas during the chronic phase, infection of cardiomyocytes becomes relevant, and the disease shows a continuous progression from cardiomyocyte destruction to substitution with fibrosis and compensatory hypertrophy, leading finally to cardiac dilatation (Pereira Barretto et al., 1986; Machado et al., 2012). Simultaneously, the prolonged stimulation of inflammatory responses also contributes to myocarditis, fibrosis, hypertrophic cardiomyopathy (HCM), and then to dilated cardiomyopathy (DCM), with consequent heart failure that can even lead to death (Higuchi et al., 2003).

Transcriptomics studies have shown that in the context of heart disease, CCC has molecular signatures which differentiate it from DCM, such as immune responses, lipid metabolism, and mitochondrial oxidative phosphorylation pathways, selectively up-regulated in myocardial tissue of patients with CCC, when compared with DCM (Cunha-Neto et al., 2005). The expression profiles of myocardial tissues from patients with HCM, a critical step in the progression of CCC, showed that a high number of genes related to protein synthesis and oxidative phosphorylation pathways were up-regulated (Yang et al., 2015), whereas Udoko et al. (2016) found a set of fibrotic-associated genes regulated early during the infection process in human cardiomyocytes (Udoko et al., 2016). T. cruzi infection assayed in murine cardiomyocytes (in vitro and in vivo) showed that hundreds of genes were differentially expressed in response to the infection, most of them related to inflammation processes, immune response, oxidative phosphorylation, and cytoskeleton organization (Garg et al., 2003; Vyatkina et al., 2004; Mukherjee et al., 2008; Goldenberg et al., 2009; Manque et al., 2011). It is noteworthy that most of the gene profiling studies in the context of CCC were performed in murine models and in addition, the initial stages of T. cruzi infection in human cardiomyocytes remains poorly understood.

Different works found the activation of AKT in *T. cruzi* infected cells (Chuenkova et al., 2001; Woolsey et al., 2003),

and perturbations in the host mTORC1 pathway were also described in *T. cruzi* infected HeLa (Caradonna et al., 2013) and macrophages (Rojas Marquez et al., 2018) cells. The PI3K/AKT pathway, can lead to the phosphorylation of the serine/threonine mTOR kinase which then can form the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1). This complex is sensitive to rapamycin treatment and its activation leads to phosphorylation of different substrates including eukaryotic translation initiation factor 4E (eiF4E)-binding proteins (4E-BPs), and ribosomal protein S6 kinases (S6K). The phosphorylation of these substrates can stimulate protein synthesis (Morita et al., 2015). Particularly the phosphorylation of 4E-BP1 has been associated with an increase in mitochondrial activity and biogenesis (Morita et al., 2013).

In this work we analyzed the early response of primary human cardiomyocytes to *T. cruzi* infection, and we found that soon after infection hundred of genes were up-regulated. Pathway analysis revealed the up regulation of genes belonging to mitochondrial energy metabolism and protein synthesis (further confirmed at the metabolic and cell level), via m-TORC1 activation, resembling molecular mechanisms of evolution to cardiac hypertrophy. Together, these results suggest that early *T. cruzi* infection induces metabolic modeling of cardiomyocytes, which may contribute to heart damage in Chagas disease.

## MATERIALS AND METHODS

# Cell Cultures, Parasites, and Infection Assays

Human primary cardiomyocytes (Celprogen) derived from adult cardiac tissue were grown in Human Cardiomyocyte primary Cell Culture medium (Celprogen) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL) at 37°C in a 5% CO2 atmosphere. Dm28c T. cruzi strain of TcI lineage was used throughout this work (Contreras et al., 1985). For infection assays, semi-confluent cardiomyocytes were infected with cellderived trypomastigotes (10:1 parasite: cell ratio), centrifuged for 5 min at 1500 rpm, and incubated for 2 h to allow invasion, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in the cardiomyocyte medium without serum. After the interaction period, parasites were removed, and cells were washed 5-times with PBS and incubated with complete cardiomyocyte medium. Cell samples were taken at 0, 3, 6, and 12 h after the interaction period henceforth named  $t_0$ ,  $t_3$ ,  $t_6$ , and  $t_{12}$ , respectively. In some cases, samples were taken 24 and 48 h post-interaction period. To examine the effect of mTOR inhibition on T. cruzi invasion and cellular response, cells were first incubated with 2.5 µM rapamycin (Sigma) for 24 h, washed, and then used for infection assays as described above. Resazurin (Sigma) reduction was used to evaluate the viability of the cells treated with rapamycin, as described by O'Brien et al. (2000).

The Primary Umbilical Vein Endothelial Cells (Huvec) were purchased from ATCC, culture in a specific Vascular Cell Basal Medium (ATCC) supplemented with the Endothelial Cell Growth Kit-BBE (ATCC).

## **RNA Extraction and Gene Profiling**

Total RNA was isolated with Direct-zol RNA MiniPrep kit (Zymo) as described by the manufacturer, and treated with RNase-free DNase to remove contaminating DNA. Total RNA samples were quantified in a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies). RNA quality was assessed with Agilent 2100 Bioanalyzer, and only samples with RIN (RNA integrity number) above 7 were used. Microarray analysis was performed by using a Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray (Agilent) in a one-color design. Briefly, 200 ng 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, United States). The quality of each cRNA sample was verified by total yield and specificity calculated based on NanoDrop ND-1000 spectrophotometer measurements (NanoDrop Technologies, United States). Then, we proceeded with the hybridization, washing and assembling of the chips according to the protocol specified by Agilent. The slides were scanned using an Agilent microarray scanner G2565BA at default settings for all parameters. We used Agilent Feature Extraction (version 9.5.1) for quality control, data filtering, and data normalization. Three biological replicates were performed for  $t_0$  and  $t_3$  time-points, and two each for  $t_6$  and  $t_{12}$  time-points. Data processing was performed using GeneSpring GX software package (version 12.0, Agilent Technologies). Genes significantly up- and down-regulated were identified by the ANOVA-test with a *p*-value of 0.01 and a Benjamini–Hochberg false discovery rate correction for multiple testing.

## **Quantitative RT-PCR**

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. Primer sequences and expected product length of amplicons are listed in Supplementary Table S1. Most of the primers span an exonexon junction to avoid DNA amplification. Real-time reactions were performed using 5 µL SybrGreen (KAPA SYBR FAST Universal 2X qPCR Master Mix, Kapa Biosystems), 200 nM of forward and reverse primers, and 1 µL of a 1/5th dilution of 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. Also agarose gels electrophoresis and Sanger sequencing were done in some cases (ldhb, mdh2, rps10, and pgc-1a) to verify the expected PCR product. The threshold cycle (CT) value for each gene was normalized to gapdh, calculating the  $\Delta Ct$  for each gene in all samples 2-3 replicates of control and infected cells at different hours post interaction (hpi). 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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . For measurement of mtDNA, total DNA was extracted with DNAzol kit (Invitrogen). mtDNA levels were measured by a real-time, quantitative PCR using specific primers for the fragment 7122–7285 of the mitochondrial genome RN39 (Sequence ID: MF681706.1). Amplification of mtDNA was measured using the Kapa SYBR fast master mix (Kapa Biosystems), and was expressed relative to the nuclear  $\beta$  –actin gene, using the  $\Delta\Delta Ct$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

# Western Blot and Immunofluorescence Assays

Polyclonal antibody against 4EBP1 (#9452) and monoclonal antibodies against mTORC1 (#2983), phospho-mTOR (#5536), p70S6K (#2708), phospho-p70S6K (#9234), phospho-4EBP1 (#9452), AKT (#4685), phospho-AKT (#2965) phospho-AKT (ser 473) (#4060) were purchased from Cell Signaling Technology. GAPDH antibody was purchased from Sigma. T. cruzi protein extracts (20 µg) were loaded and a 12% polyacrylamide gel (SDS-PAGE) were run under reducing conditions and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare). Membranes were blocked in 5% non-fat dry milk in TBS for 16 h at 4°C or 1 h at room temperature. After washing with TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST), membranes were incubated with an 1/1000 dilution of antibodies in 5% Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) in TBST overnight at 4°C, washed and incubated with peroxidase-conjugated goat antirabbit or anti-mouse secondary antibody (Sigma). The signal was developed with Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

For indirect immunofluorescence (IIF), harvested and washed cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized and blocked with 0.5% saponin/4% BSA in PBS. Slides were incubated for 1 h with anti-Cyt C antibody (Abcam), diluted 1:100 in 0.5% saponin/4% BSA in PBS. After three washes with PBS-0.5% saponin, slides were incubated with ALEXA-488 conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000 dilution, from Invitrogen), and washed 3 times with PBS-0.5% saponin. Finally, slides were mounted with Prolong antifade with DAPI (Invitrogen), and visualized under an Olympus IX 81 microscope coupled to a Hamamatsu Orca-ER camera (Diagnostic Instruments).

# Bioenergetic Profiling of Human Cardiomyocytes

The oxygen consumption rates  $(QO_2)$  and proton production rates (PPR) were measured by using a Seahorse Bioscience XF24 Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). For this, cardiomyocytes were seeded (5 × 10<sup>4</sup> cells/well) and incubated at 37°C in complete media for 24 h before the experiment. The culture media was changed 1 h prior to the assay to unbuffered Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, pH 7.4) supplemented with L-glutamine (2 mM; Gibco), glucose (5 mM) and pyruvate (1 mM). Oligomycin (inhibitor of ATP synthase, complex V), FCCP (uncoupling agent) and a mix of antimycin A (AA, complex III inhibitor) and rotenone (Rot, complex I inhibitor) were injected sequentially through ports in the seahorse flux pack cartridges to final concentrations of 2.0, 1.0, and 1.0  $\mu$ M, respectively. After subtracting the nonmitochondrial respiration (oxygen consumption in the presence of AA-ROT) from each data, QO<sub>2</sub> were normalized against cell counts and reported as pmol O<sub>2</sub>/min/10<sup>4</sup> cells. Basal respiration, maximal respiration (QO<sub>2</sub> in the presence of FCCP), spare respiratory capacity (QO<sub>2</sub> with FCCP- basal QO<sub>2</sub>), and the respiratory control ratio (RCR, QO<sub>2</sub> with FCCP/QO<sub>2</sub> with oligomycin) were then calculated. Five replicates per condition were analyzed in each plate assay, and at least three independent experiments were performed.

To analyze glycolytic function, cells were cultured as above without glucose and pyruvate. Then, glucose (10 mM), oligomycin (1  $\mu$ M) and 2-deoxy-glucose (100 mM) were added sequentially. Oligomycin stops mitochondrial ATP synthesis and shifts the energy production pathway to glycolysis, with the subsequent increase in PPR revealing the cellular maximum glycolytic capacity. 2-deoxy-glucose, a glucose analog inhibits glycolysis by binding to hexokinase. To evaluate the  $\beta$ -oxidation of endogenous fatty acids we used the inhibitor of carnitine palmitoyltransferase, etomoxir (100  $\mu$ M, Sigma), which prevents the formation of acyl carnitines, a step necessary for the transport of fatty acyl chains from the cytosol to the mitochondria. The QO<sub>2</sub> was measured as above after the addition of etomoxir in infected and control cells. All experiments were performed three times independently.

## **Oxidants Determination**

Cells were incubated with *T. cruzi* and washed 2 h after, to remove free parasites. 24 h later cells were washed with RPMI and incubated with 100  $\mu$ M (45 min at 37°C) 2'7'-dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma); DCFH-DA oxidation by reactive oxygen species (ROS) was analyzed by flow cytometry.

## T. cruzi Infectivity Assays

Cardiomyocytes were treated with different concentrations (from 0.625 to 5  $\mu$ M) of rapamycin (Sigma) for 24 h. Then the cells were washed, plated and infected with  $\beta$ -galactosidase expressing trypomastigotes at a ratio of 10 parasites to 1 cell. After 2 h of infection, non-internalized parasites were washed out. After 48 h, monolayers were washed and assays were developed using CPRG as a  $\beta$ -galactosidase substrate as previously described (Faral-Tello et al., 2014), and quantified by measuring the absorbance at 570 nm using an ELx800 Universal Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, United States). Wells with no drug were considered as the 100% of parasite replication.

## **Statistical Analysis**

Statistical significance between two groups was estimated using the unpaired Student's *t*-test. Differences in the bioenergetic profiles were calculated by XGe-96 software and GraphPad Prism software, using one-way ANOVA and Student's *t*-test calculations. A *p*-value less than 0.05 was considered significant in all cases. TABLE 1 | Expression of energy metabolism associated genes.

Gene	Complex/location	0 h	3 h	6 h	12 h
ATP5E	Complex V	40.1	31.4	31.1	24.1
ATP6	Complex V	13.4	6.1	6.2	8.5
COX6c	Complex IV	5.4	3.4	6.1	7.0
NDUFB4	Complex I	9.2	3.2	4.8	7.7
NDUFB8	Complex I	4.8	4.2	3.7	3.9
CYTB	Complex III	3.9	5.2	1.8	3.2
UQCRFS1	Complex III	5.0	1.8	2.1	3.7
LDHB	Cytosolic	11.7	13.0	7.5	4.0
MDH2	Mitochondrial	7.9	10.2	6.5	10.7

The values represent the Fold changes (Fc) of infected vs. control cells obtained with the Agilent microarray experiment ( $p \le 0.01$  and Fc  $\ge 2$ ).

## RESULTS

## Energy Metabolism and Protein Synthesis Related Genes Are Strongly Up-Regulated in Response to *T. cruzi* Infection

The effect of T. cruzi infection on gene expression in human primary cardiomyocytes was investigated at 0 h (invasion phase), 3 h (intra-phagosomal amastigotes in the non-replicative phase), 6 h (release of amastigotes to host cytoplasm) and 12 h (cytosolic amastigotes, replicative phase) post-interaction. Cells incubated for similar number of hours without T. cruzi were used as controls. Genes showing at least a twofold change in their expression and a 99% probability of being differentially expressed ( $p \le 0.01$ ) were considered (**Supplementary Table S2**). Our data showed that more than 290 genes were up-regulated in response to T. cruzi infection whereas less than 25 genes were down-regulated (Figure 1A). The hierarchical clustering of the differentially expressed genes clearly discriminated between control and infected cardiomyocytes (Figure 1B). More than 250 genes were up-regulated in expression in infected cardiomyocytes at 0 h post-interaction phase, and a majority of these remained up-regulated (Figure 1Ca) and only 3 remained down-regulated (Figure 1Cb) with progression of infection phase. Gene Ontology and pathway analysis showed important changes in the expression of genes related to protein synthesis and energy metabolism, mainly electron transport chain, oxidative phosphorylation and Krebs cycle, were significantly increased in expression in infected cardiomyocytes (Table 1 and Figure 2A). Representative genes of each pathway were further confirmed by real time PCR (Figure 2B). We also did an expression kinetic analysis for some of the genes related to energy metabolism, (mdh2, ldhb, and ndufb4) finding that they were overexpressed between 0 and 24 hpi (Figure 2C). Together, the results presented in Figure 2, and Table 1 indicate that cardiomyocytes respond to T. cruzi invasion with an immediate increase in the expression of genes related to mitochondrial oxidative metabolism, and this increase in oxidative metabolic gene response is maintained during parasite replication within the infected cardiomyocytes.



## Increased Cardiomyocyte Mitochondrial Energy Metabolism as an Early Response to *T. cruzi* Infection

To determine how the changes in gene expression impact the metabolic profile of infected cardiomyocytes, we evaluated oxidative energy metabolism by using the extracellular flux analyzer technology. Infected and control cardiomyocytes were cultured in un-buffered DMEM in the presence of glucose, pyruvate and glutamine, and the QO<sub>2</sub> was measured after the sequential addition of oligomycin (inhibitor of ATP synthase, complex V), FCCP (uncoupling agent) and a mix of antimycin A (AA, complex III inhibitor) and rotenone (Rot, complex I inhibitor). As indicated in material and methods the basal respiration can be derived by subtracting to the initial OCR the non-mitochondrial respiration. The maximal respiratory capacity is derived by subtracting non-mitochondrial respiration from the FCCP rate and the spare capacity is calculated by subtracting basal respiration from maximal respiratory capacity. No significant differences were observed in QO<sub>2</sub> between normal vs. infected cells at 6 hpi, whereas by 24 hpi, cardiomyocytes exhibited a substantial increase in QO<sub>2</sub> of respiration (Figure 3). As early as 17 hpi, the basal and maximal QO<sub>2</sub> as well as the spare respiration capacity were significantly increased in infected cells as compared to that noted in matched, control cardiomyocytes (Figure 3B). In order to evaluate if these changes corresponded to a general response to T. cruzi infection, we performed the same assay in previously studied HeLa cells (Chiribao et al., 2014) at 24 hpi, and no significant differences were observed in QO2 values (Supplementary Figure S1).

We then studied the contribution of glycolysis to the enhanced respiratory activity, through measurements of  $QO_2$ and PPR when glucose was added as the only exogenous energy carbon source, in the presence or absence of 2-deoxy glucose (2DG). No significant differences in the glycolytic capacity of control and *T. cruzi* infected cardiomyocytes were observed (**Figures 4A,B**). Finally, to evaluate the oxidation of endogenous fatty acids as energy source, we compared mitochondrial  $QO_2$  in the presence or absence of etomoxir and, as for the glycolytic pathway, no differences were observed in the capacity of fatty acid oxidation (**Figures 4C,D**). Together, these results suggest that the cardiomyocytes respire more to support the electron transport chain linked oxidative phosphorylation in response to infection by *T. cruzi*.

# *T. cruzi* Infection Induces Mitochondrial Biogenesis in Human Cardiomyocytes

We next determined if the increase in the  $QO_2$  in infected cardiomyocytes could be related to mitochondrial biogenesis. For this purpose we compared a specific DNA region of the mitochondrial genome relative to a nuclear gene (see section "Materials and Methods"), and we found a sixfold increase in mitochondrial DNA in infected cardiomyocytes (**Figure 5A**). Mitochondrial biogenesis was further explored by immunofluorescence microscopy using anti-cytochrome C antibody, and the results clearly evidenced an increase in the mitochondrial content (Figures 5B,C). Interestingly, we observed the presence of ring-like donut mitochondria in infected cardiomyocytes, which could be associated to a mild increase in mitochondrial oxidant generation (Liu and Hajnoczky, 2011; Ahmad et al., 2013). To elucidate whether cellular oxidants were increased in infected cardiomyocytes, we used the DCFH-DA probe (detects intracellular ROS), and we found a twofold increase in the relative intensity of DCF fluorescence (Figure 5D). Finally, since PGC-1 $\alpha$  is described as a regulator of mitochondrial biogenesis (Fernandez-Marcos and Auwerx, 2011), we compared its expression in infected and noninfected cardiomyocytes, and no significant differences were found (Figure 5E). These results suggest that cardiomyocytes infected by T. cruzi increase the PGC-1α independent mitochondrial biogenesis to support the increased oxidative respiration and consequent increase in ROS production.

When HeLa cells were analyzed, no changes at the mtDNA level were found (**Figure 5A**). We also evaluated infected HUVEC cells, in order to include another primary human cell in the assay, and no changes in mtDNA content were observed (**Figure 5**). Taken together these results indicate that mitochondrial biogenesis probably constitutes a cardiomyocyte specific response to *T. cruzi* infection.

## Activation of the AKT/mTORC1 Signaling Pathway in Infected Cardiomyocytes

In addition to an increase in mitochondrial energy metabolism, several of the genes related to protein synthesis were also up-regulated in cardiomyocytes during early infection phase (Figure 2 and Supplementary Table S3). This observation led us to hypothesize that mTORC1, an AKT dependent signaling cascade that coordinates both mitochondrial activity and protein synthesis (Laplante and Sabatini, 2009), might be activated in infected cardiomyocytes. We therefore evaluated the activation of mTORC1 pathway by studying the phosphorylation state of different members of this cascade. Our data showed that at 24 hpi, AKT/mTORC1 cascade was activated, as evidenced by the higher levels of phospho-AKT, phospho-mTOR, phospho-4EBP1, and phospho-p70S6 kinase in infected (vs. control) cardiomyocytes (Figure 6). To test if mTORC1 activation was involved in mitochondrial bioenergetics increase, we treated the infected cardiomyocytes with rapamycin (specific inhibitor of mTORC1). We first confirmed that rapamycin inhibits mTORC1 phosphorylation in our experimental conditions (Figures 7A,B). We then measured the oxygen consumption rate, and found that treatment with rapamycin inhibited the T. cruzi induced increase in the maximal respiration and spare reserve capacity in infected cardiomyocytes, and infected cells exhibited similar levels of respiration as was noted in controls (Figure 7C). Moreover, the relative increase in mtDNA content observed in infected (vs. normal control) cells was subsided when infected cardiomyocytes were treated with rapamycin (Figure 7D).



FIGURE 2 | Pathway analysis and R1-qPCH. (A) Heat map of the most significantly altered pathways from the differentially expressed genes ( $p \le 0.01 \text{ Fc} \ge 2$ ). C and I denotes control and infected cardiomyocytes respectively. (B) Quantification of selected genes by real-time PCR. The bars shows the relative fold changes of up-regulated genes (*rps10, rpl37, eif3h, ndufb4, ldhb, mdh2, anxa1, hla-c*) analyzed by qPCR at  $t_0$ . Values are means of three biological replicates  $\pm$  SEM. \* $p \le 0.05$ . The dotted line shows the value at which there is no difference in expression (1) between infected and control cells. (C) Kinetic expression (1) between infected and control cells. Values are means of two or three biological replicates  $\pm$  SEM. \* $p \le 0.05$ .



**FIGURE 3** | Mitochondrial bioenergetics. (A)  $QO_2$  were evaluated in control (filled circles) and infected (open circles) cells at 6 or 24 hpi following the addition of oligomycin (2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M) and AA-ROT (1  $\mu$ M each).  $QO_2$  is expressed as pmol  $O_2$  consumed/min/10<sup>4</sup> cardiomycoytes and are the mean of three independent determinations. (B) Mitochondrial bioenergetics parameters were calculated after subtraction of non-mitochondrial respiration ( $QO_2$  after AA-ROT addition) to all data. Basal respiration (no drug added), maximal respiration ( $QO_2$  after FCCP addition) and spare respiratory capacity (calculated as the ratio between  $QO_{2FCCP}$  and  $QO_{2BASAL}$ ) at the different time points analyzed (6, 17, and 24 hpi). Each data point represent the mean  $\pm$  SEM n = 10. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

Finally, we analyzed whether treatment with rapamycin affects the infection, and we did not find significant differences in the burden of intracellular amastigotes in the presence of the drug (Figure 7E). Rapamycin treatment did not affect the viability of the cells (Supplementary Figure S2A) and did not inhibit mTORC2 (Supplementary Figure S2B) in these conditions.

## DISCUSSION

Chronic cardiomyopathy is the most severe manifestation of Chagas disease (Rassi et al., 2017). In the heart *T. cruzi* is able to infect a wide variety of cells including endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, and cardiomyocytes (Mukherjee et al., 2004). It has long been demonstrated



through histological analysis of biopsies, that morphological changes in cardiomyocytes such as myofiber hypertrophy, had a good correlation with the clinical manifestation and severity of heart disease (Higuchi et al., 1987; Higuchi, 1995). In the present study we found that *T. cruzi* remodeled the global pattern of gene expression in human cardiomyocytes, by up-regulating hundreds of genes immediately after infection, being mitochondrial energy metabolism and protein synthesis the most up-regulated pathways. When similar experiments were performed on HeLa cells (Chiribao et al., 2014), a completely different landscape was found: the most up-regulated pathways were related to immune/inflammatory responses, indicating that *T. cruzi* is able to remodel host gene expression through cell type-specific programs.

We found here an increase in basal and maximal respiration, as well as in spare respiratory capacity, which is accompanied by mitochondrial biogenesis. Remarkably, our transcriptomics results significant differ from previous studies in murine cardiomyocytes. Manque et al. (2011) found that the most up-regulated pathways in the early infection were related to a inflammatory response, whereas mitochondrial energetic related genes did not change significantly. Also by using murine cardiomyocytes a decrease in oxidative phosphorylation was reported (Vyatkina et al., 2004; Estrada et al., 2018). However, our results are in agreement with gene profiling studies on human heart biopsies. Indeed, comparison between patients whit CCC and DCM showed that CCC and not DCM, is characterized by an up-regulation of genes involved in oxidative phosphorylation and proton transfer chain, and both diseases exhibit up-regulation of protein synthesis related genes (Cunha-Neto et al., 2005). Furthermore, a similar analysis comparing myocardial tissues from HCM vs. healthy patients showed that the most altered pathways were protein synthesis and oxidative phosphorylation (Yang et al., 2015). Remarkably, the two HCM molecular marker genes matrix metalloproteinase 1 (mmp1) (Miura et al., 2003), and Atrial Natriuretic Peptide (npr1) (Zoccali et al., 2001) were up-regulated in response



to infection (see **Supplementary Table S2**). These results suggest that the model used in this work may be adequate for studying molecular mechanisms of pathogenesis, and that cardiomyocyte gene expression remodeling in response

to infection contributes to molecular basis of Chagas heart disease.

The AKT dependent mTORC1 pathway regulates mitochondrial activity and biogenesis, as well as protein



synthesis (Zoncu et al., 2011; Roux and Topisirovic, 2012; Morita et al., 2013, 2015; Nandagopal and Roux, 2015). Since most of the ribosomal proteins and translation factors coding genes were induced upon infection, we hypothesized that mTORC1 was at the basis of these changes, and we clearly showed its activation, whereas mTORC2 remained unchanged in both conditions. The direct implication of mTORC1 was further demonstrated by the use of rapamycin: the presence of the drug abolished the differences between infected and non-infected cells, both at the metabolic level and mtDNA content. Changes in host mTOR related pathways in response to T. cruzi infection have been already described in other cell lines such as HeLa (Caradonna et al., 2013) and macrophages (Rojas Marquez et al., 2018). However, the consequences of this activation are different depending on the cell type, which reinforces the concept of the infection plasticity of this parasite, which is not only able to infect almost any kind of cells but also, by inducing similar pathways, each cell or tissue has specific signal transduction hallmarks. In fact, we further confirmed that neither HeLa cells nor primary HUVEC cells showed a mitochondrial biogenesis phenotype. As mentioned, mitochondrial biogenesis was found to be directly related to mTOR activation: when cells were incubated with rapamycin the mtDNA content in infected cells vs. controls did not differ, and correspond to a pgc-1α independent mechanism of mitochondria biogenesis, previously described (Morita et al., 2013). It is noteworthy that parasite burden did not change in presence of rapamycin, which suggests that increase in oxidative respiration and

subsequent increase in ROS production do not seem to constitute a host defense mechanism, but a side effect that damages the cardiomyocytes, leading to a pathological phenotype (Gupta et al., 2009; Roux and Topisirovic, 2012). Interestingly, reversion of the pathological phenotype by rapamycin draws our attention about host-targeted therapies in Chagas disease, where most of the efforts have been oriented to the parasitological cure. However, since its most severe manifestation is heart damage, which take years to manifest clinical signs, the understanding of molecular mechanisms of pathogenesis of CCC may allow to identify potentially new targets in the hosts, for developing new therapeutic strategies of combined treatment focused toward both parasitological and clinical cure. Similar strategies are already being assayed in other intracellular and persistent pathogens, as for example Mycobacterium tuberculosis (Javachandran et al., 2012; Tomioka, 2014).

In conclusion, a key finding of this work is the ability of *T. cruzi* to induce an mTORC1 mediated increase in respiration and mitochondrial content, immediately after infection of human cardiomyocytes. This altered phenotype resembles the main differences found between HCM vs. normal cardiac tissues, and CCC vs. DCM, which lead us to propose that these changes are at the basis of the molecular mechanism of pathogenesis in CCC. The finding that the drug rapamycin can revert this phenotype opens a promising perspective in the treatment of Chagas disease: the use of combined and complementary parasite and host targeted therapies.



**FIGURE 7** [Effect of rapamycin. (A) Western blot analysis of phosphorylated and non-phosphorylated p70S6k in control and infected cardiomyocytes at 24 hpi (C, I), vs. the same cells treated with rapamycin for 24 h before the infection (CR, IR). (B) Densitometric analysis of two independent experiments showing p-p70S6k protein expression normalized against the non-phosphorylated protein in control cells (\*p < 0.05). (C) Kinetic of QO<sub>2</sub> response to oligomycin (2.0  $\mu$ M), FCCP (1.0  $\mu$ M) and AA-ROT (1.0  $\mu$ M each) in control and *T. cruzi* infected cardiomyocytes cells 24 hpi with and without Rapamycin treatment (2.5  $\mu$ M for 24 h before infection). Arrows indicates the injection of the different additions. Basal respiration (no drug added) and maximal respiration (QO<sub>2</sub> after FCCP addition) with and without the rapamycin treatment were calculated. Each data point represent the mean  $\pm$  SEM n = 5. \*p < 0.05. (D) Relative fold changes of the mtDNA gene relative to the nuclear gene beta actin in infected cardiomyocytes (I), infected cardiomyocyte treated with rapamycin (2.5  $\mu$ M) 24 h before infection (IR), and controls treated with rapamycin (2.5  $\mu$ M) (CR) versus control cells 4 phi (C). Values are the mean of three biological replicates  $\pm$  SEM (\*\*\*p < 0.0002). (E) Percentage of amastigote replication and trypomastigote infection in comparison with an untreated control (100%). Cardiomyocytes were treated with different rapamycin concentrations for 24 h, washed and infected with *T. cruzi*. Each point of the curve represents the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

ML: data collection, analysis and interpretation, and wrote the article. PF-T: cell culture, infection experiments, and interpretation. NG: design of the work and critical revision of the article. RR: data interpretation and critical revision of the article. LP: seahorse experiments, analysis, interpretation, and wrote the article. CR: conception and design of the work, data interpretation, and wrote the article.

### **FUNDING**

This work was supported by FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund) grant COF 03/11, and Research Council United Kingdom Grand Challenges Research Funder 'A Global Network for Neglected Tropical Diseases' grant number MR/P027989/1. ML and PF-T are research fellowships from ANII Uruguay.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Luis Badano and Carlos Escande (Institut Pasteur de Montevideo) for technical assistance in mTOR studies, and Marcela Díaz (IPM) for microscopy assistance.

## REFERENCES

- Ahmad, T., Aggarwal, K., Pattnaik, B., Mukherjee, S., Sethi, T., Tiwari, B. K., et al. (2013). Computational classification of mitochondrial shapes reflects stress and redox state. *Cell Death Dis.* 4:e461. doi: 10.1038/cddis.2012.213
- Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21:11. doi: 10.1051/parasite/2014012
- Caradonna, K. L., Engel, J. C., Jacobi, D., Lee, C. H., and Burleigh, B. A. (2013). Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe* 13, 108–117. doi: 10.1016/j.chom.2012.11.011
- Chiribao, M. L., Libisch, G., Parodi-Talice, A., and Robello, C. (2014). Early *Trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells. *Biomed Res. Int.* 2014:439501. doi: 10.1155/2014/439501
- Chuenkova, M. V., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., and Pereira, M. A. (2001). *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.* 98, 9936–9941. doi: 10.1073/pnas.161298398
- Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M., and Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 315–327. doi: 10.1016/0166-6851(85) 90073-8
- Coura, J. R. (2015). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions–a comprehensive review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 277–282. doi: 10.1590/0074-0276140362
- Coura, J. R., and Vinas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 465, S6–S7. doi: 10.1038/nature09221
- Cunha-Neto, E., Dzau, V. J., Allen, P. D., Stamatiou, D., Benvenutti, L., Higuchi, M. L., et al. (2005). Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* 167, 305–313. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62976-8
- Dias, E., Laranja, F. S., Miranda, A., and Nobrega, G. (1956). Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 14, 1035–1060. doi: 10.1161/01.CIR.14.6.1035
- Dumonteil, E., Bottazzi, M. E., Zhan, B., Heffernan, M. J., Jones, K., Valenzuela, J. G., et al. (2012). Accelerating the development of a therapeutic vaccine

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb. 2018.01889/full#supplementary-material

**FIGURE S1** | QO<sub>2</sub> in HeLa cells. Kinetic of QO<sub>2</sub> response to oligomycin (2  $\mu$ M), FCCP (1  $\mu$ M) and AA-ROT (1  $\mu$ M each) in control and *Trypanosoma cruzi* infected HeLa cells 24 hpi. Arrows indicates the injection of the different additions. No statistical differences were observed in any mitochondrial bioenergetics parameters between both conditions.

**FIGURE S2** | Evaluation of cell viability and mTORC2 after Rapamycin treatment. **(A)** Resazurin (Sigma) reduction was used to evaluate the viability of the cells treated with rapamycin at different concentrations for 24 h. The viability of the cells without rapamycin was considered as 100%. **(B)** mTORC1 and mTORC2 evaluation in cardiomyocytes treated with rapamycin (2.5  $\mu$ M) for 24 h, washed and infected with *T. cruzi*. The proteins were collected 24 hpi. The relative p-AKT (ser 473) expression was normalized against total AKT for mTORC2 evaluation. The same membrane was stripped and evaluated for mTORC1 with the p-p70S6k antibody normalized against the non-phosphorylated p70S6k. Densitometry analysis of mTORC2 western blots. Values represents the mean  $\pm$  standard deviation of two independent biological replicates.

**TABLE S1** | Primer sequences and expected product length.

TABLE S2 | Microarray differentially expressed genes.

**TABLE S3 |** Differentially expressed genes related to Ribosomal proteins and Translation factors (Fc  $\geq$  2,  $\rho \leq$  0.01).

for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev. Vaccines* 11, 1043–1055. doi: 10.1586/erv.12.85

- Estrada, D., Specker, G., Martinez, A., Dias, P. P., Hissa, B., Andrade, L. O., et al. (2018). Cardiomyocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. *Biochem. J.* 475, 1235–1251. doi: 10.1042/BCJ20170698
- Faral-Tello, P., Liang, M., Mahler, G., Wipf, P., and Robello, C. (2014). Imidazolium compounds are active against all stages of *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Antimicrob. Agents 43, 262–268. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.019
- Fernandes, M. C., and Andrews, N. W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 734–747. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x
- Fernandez-Marcos, P. J., and Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. Am. J. Clin. Nutr. 93, 884S–890S. doi: 10.3945/ajcn.110.001917
- Garg, N., Popov, V. L., and Papaconstantinou, J. (2003). Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochim. Biophys. Acta* 1638, 106–120. doi: 10.1016/ S0925-4439(03)00060-7
- Goldenberg, R. C., Iacobas, D. A., Iacobas, S., Rocha, L. L., da Silva de Azevedo Fortes, F., Vairo, L., et al. (2009). Transcriptomic alterations in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes Infect.* 11, 1140–1149. doi: 10.1016/j.micinf.2009.08.009
- Gupta, S., Bhatia, V., Wen, J. J., Wu, Y., Huang, M. H., and Garg, N. J. (2009). *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1414–1421. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.008
- Higuchi, M. D. (1995). Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. *Sao Paulo Med. J.* 113, 821–825. doi: 10.1590/ S1516-31801995000200013
- Higuchi, M. L., De Morais, C. F., Pereira Barreto, A. C., Lopes, E. A., Stolf, N., Bellotti, G., et al. (1987). The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin. Cardiol.* 10, 665–670. doi: 10.1002/clc.4960101113

- Higuchi, Y., Otsu, K., Nishida, K., Hirotani, S., Nakayama, H., Yamaguchi, O., et al. (2003). The small GTP-binding protein Rac1 induces cardiac myocyte hypertrophy through the activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and nuclear factor-kappa B. *J. Biol. Chem.* 278, 20770–20777. doi: 10.1074/jbc. M213203200
- Jayachandran, R., Scherr, N., and Pieters, J. (2012). Elimination of intracellularly residing *Mycobacterium tuberculosis* through targeting of host and bacterial signaling mechanisms. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 1007–1022. doi: 10.1586/eri.12.95
- Laplante, M., and Sabatini, D. M. (2009). mTOR signaling at a glance. J. Cell Sci. 122, 3589–3594. doi: 10.1242/jcs.051011
- Lewis, M. D., and Kelly, J. M. (2016). Putting infection dynamics at the heart of chagas disease. *Trends Parasitol.* 32, 899–911. doi: 10.1016/j.pt.2016. 08.009
- Liu, X., and Hajnoczky, G. (2011). Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death Differ*. 18, 1561–1572. doi: 10.1038/cdd.2011.13
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Machado, F. S., Jelicks, L. A., Kirchhoff, L. V., Shirani, J., Nagajyothi, F., Mukherjee, S., et al. (2012). Chagas heart disease: report on recent developments. *Cardiol. Rev.* 20, 53–65. doi: 10.1097/CRD.0b013e31823 efde2
- Manque, P. A., Probst, C. M., Pereira, M. C., Rampazzo, R. C., Ozaki, L. S., Pavoni, D. P., et al. (2011). *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes. *Infect. Immun.* 79, 1855–1862. doi: 10.1128/IAI. 00643-10
- Matta Guedes, P. M., Gutierrez, F. R., Nascimento, M. S., Do-Valle-Matta, M. A., and Silva, J. S. (2012). Antiparasitical chemotherapy in Chagas' disease cardiomyopathy: current evidence. *Trop. Med. Int. Health* 17, 1057–1065. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03025.x
- Meymandi, S. K., Forsyth, C. J., Soverow, J., Hernandez, S., Sanchez, D., Montgomery, S. P., et al. (2017). Prevalence of Chagas disease in the latin American-born population of los angeles. *Clin. Infect. Dis.* 64, 1182–1188. doi: 10.1093/cid/cix064
- Miura, S., Ohno, I., Suzuki, J., Suzuki, K., Okada, S., Okuyama, A., et al. (2003). Inhibition of matrix metalloproteinases prevents cardiac hypertrophy induced by beta-adrenergic stimulation in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42, 174–181. doi: 10.1097/00005344-200308000-00004
- Morita, M., Gravel, S. P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., et al. (2013). mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell Metab.* 18, 698–711. doi: 10.1016/j. cmet.2013.10.001
- Morita, M., Gravel, S. P., Hulea, L., Larsson, O., Pollak, M., St-Pierre, J., et al. (2015). mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14, 473–480. doi: 10.4161/15384101.2014.991572
- Morris, S. A., Tanowitz, H. B., Wittner, M., and Bilezikian, J. P. (1990). Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. *Circulation* 82, 1900–1909. doi: 10.1161/01.CIR.82.6.1900
- Mukherjee, S., Huang, H., Petkova, S. B., Albanese, C., Pestell, R. G., Braunstein, V. L., et al. (2004). *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signalregulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Infect. Immun.* 72, 5274–5282. doi: 10.1128/IAI.72.9.5274-5282.2004
- Mukherjee, S., Nagajyothi, F., Mukhopadhyay, A., Machado, F. S., Belbin, T. J., Campos de Carvalho, A., et al. (2008). Alterations in myocardial gene expression associated with experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Genomics* 91, 423–432. doi: 10.1016/j.ygeno.2008.01.008
- Nandagopal, N., and Roux, P. P. (2015). Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation* 3:e983402. doi: 10. 4161/21690731.2014.983402
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000. 01606.x
- Pereira Barretto, A. C., Mady, C., Arteaga-Fernandez, E., Stolf, N., Lopes, E. A., Higuchi, M. L., et al. (1986). Right ventricular endomyocardial biopsy in

chronic Chagas' disease. Am. Heart J. 111, 307–312. doi: 10.1016/0002-8703(86) 90144-4

- Perez-Molina, J. A., Perez, A. M., Norman, F. F., Monge-Maillo, B., and Lopez-Velez, R. (2015). Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 15, 1347–1356. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00243-1
- Rassi, A. Jr., Marin, J. A. N., and Rassi, A. (2017). Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the benznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 224–235. doi: 10.1590/0074-02760160334
- Rassi, A. Jr., Rassi, A., and Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. Lancet 375, 1388–1402. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Rojas Marquez, J. D., Ana, Y., Baigorri, R. E., Stempin, C. C., and Cerban, F. M. (2018). Mammalian target of rapamycin inhibition in *Trypanosoma cruzi*infected macrophages leads to an intracellular profile that is detrimental for infection. *Front. Immunol.* 9:313. doi: 10.3389/fimmu.2018.00313
- Rossi, M. A., and Bestetti, R. B. (1995). The challenge of chagasic cardiomyopathy. The pathologic roles of autonomic abnormalities, autoimmune mechanisms and microvascular changes, and therapeutic implications. *Cardiology* 86, 1–7. doi: 10.1159/000176822
- Rossi, M. A., and Ramos, S. G. (1996). Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. Am. Heart J. 132, 207–210. doi: 10.1016/S0002-8703(96) 90417-2
- Roux, P. P., and Topisirovic, I. (2012). Regulation of mRNA translation by signaling pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4:a012252. doi: 10.1101/ cshperspect.a012252
- Tanowitz, H. B., Machado, F. S., Jelicks, L. A., Shirani, J., de Carvalho, A. C., Spray, D. C., et al. (2009). Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Prog. Cardiovasc. Dis.* 51, 524–539. doi: 10.1016/j.pcad.2009. 02.001
- Tomioka, H. (2014). New approaches to tuberculosis–novel drugs based on drug targets related to toll-like receptors in macrophages. Curr. Pharm. Des. 20, 4404–4417. doi: 10.2174/1381612819666131118163331
- Udoko, A. N., Johnson, C. A., Dykan, A., Rachakonda, G., Villalta, F., Mandape, S. N., et al. (2016). Early regulation of profibrotic genes in primary human cardiac myocytes by *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10:e0003747. doi: 10.1371/journal.pntd.0003747
- Vyatkina, G., Bhatia, V., Gerstner, A., Papaconstantinou, J., and Garg, N. (2004). Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim. Biophys. Acta* 1689, 162–173. doi: 10. 1016/j.bbadis.2004.03.005
- Woolsey, A. M., Sunwoo, L., Petersen, C. A., Brachmann, S. M., Cantley, L. C., and Burleigh, B. A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. J. Cell Sci. 116, 3611–3622. doi: 10.1242/jcs.00666
- Yang, W., Li, Y., He, F., and Wu, H. (2015). Microarray profiling of long noncoding RNA (lncRNA) associated with hypertrophic cardiomyopathy. BMC Cardiovasc. Disord. 15:62. doi: 10.1186/s12872-015-0056-7
- Zoccali, C., Mallamaci, F., Benedetto, F. A., Tripepi, G., Parlongo, S., Cataliotti, A., et al. (2001). Cardiac natriuretic peptides are related to left ventricular mass and function and predict mortality in dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 1508–1515.
- Zoncu, R., Efeyan, A., and Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 21–35. doi: 10.1038/nrm3025

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Libisch, Faral-Tello, Garg, Radi, Piacenza and Robello. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## ANEXO 2

Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

# Host-pathogen transcriptomics: *Trypanosoma cruzi* as a model for studying RNA contamination



<sup>a</sup> Laboratory of Host-Pathogen Interactions-UBM, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup> Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

#### ARTICLE INFO

#### ABSTRACT

Keywords: Trypanosoma cruzi Transcriptomics Vero cells derived trypomastigotes RNA contamination Host-Pathogen interaction

intracellular microorganisms that are produced in cell lines are needed to propagate the microorganism. In this work, we demonstrate that RNA derived from Vero cells is an important contaminant to consider in order to avoid false positive results in transcriptomic experiments. We study the cross-contamination on a *Trypanosoma cruzi* cell infection model, the etiological agent of Chagas disease. We implemented the most frequently used trypanosome-purification protocols and, for all of them, we detected RNAs derived from Vero cells in trypo-mastigote extracts. For some of the protocols we also detected Vero RNAs in infected human cells. We also found this type of contamination in microarray experiments of human samples infected with *T. cruzi*. Concerning Illumina RNA-Seq data, we found that the contamination with Vero cells is probably introducing spurious results. Finally, we recommend a protocol to purify trypomastigotes, which showed a high percentage of trypomastigote recovery and the absence of Vero consider during experimental design, in order to minimize false positive results in transcriptomic studies as well as RNA contamination in vaccine production. *Significance:* Transcriptomic studies are widely used to understand host-pathogen interactions. When the pathogen is an intracellular microorganism, an additional mammalian cell system can be needed to propagate it. In

Cellular infection assays constitute essential tools to understand host-pathogen interactions, particularly for

thogen is an intracellular microorganism, an additional mammalian cell system can be needed to propagate it. In this work we demonstrate that pathogens purified from infected monolayers can carry RNAs from these mammalian cells, and that this ambient RNA contamination is probably producing false positive results in subsequent transcriptomic studies performed with qRT-PCR, microarrays or Next Generation Sequencing.

#### 1. Introduction

Vero cells, derived from *Chlorocebus sabaeus* (African green monkey) [1], constitute one of the most common mammalian cell lines used in research, particularly in host-pathogen interaction studies. They are extensively used in virology, bacteriology and protozoology, for producing the target pathogen [2]. In addition, they are used in vaccinology for the production of both live and inactivated viral vaccines [3,4]. For both host-pathogen interaction experiments and viral vaccines production, it is important to consider the possible contamination with DNA, RNA or cell debris coming from the cell line used for the microorganism propagation. An example is the production of trypomastigotes, the infective stage of the parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. Vero cells are usually used for this purpose [5], with Vero-derived trypomastigotes (VDT) being obtained

around 4–6 days after Vero infection. After invasion, parasites undergo differentiation into replicative amastigotes and differentiate again into trypomastigotes, which are released after cell lysis to the medium. Then, these VDT can be used for infection assays on different types of host cells. One aspect that is of particular interest in understanding host-pathogen interactions, is the study of host gene expression changes in response to parasite infection, mainly performed by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) of specific genes [6–8], or transcriptomic profiling with high-throughput technologies such as microarrays [9–13], and Next Generation Sequencing (NGS) [14–16]. These techniques require an amplification step of the cDNA or cRNA, implying that low levels of contamination can be amplified together with the target sequences. In qRT-PCR, 35–40 amplification cycles are normally done, increasing the possibilities that even trace amounts of RNA can end up causing false positive results [17]. In microarray experiments, the cRNA is also

https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103804 Received 9 December 2019; Received in revised form 14 April 2020; Accepted 1 May 2020 Available online 15 May 2020 1874-3919/ © 2020 Published by Elsevier B.V.







<sup>\*</sup> Corresponding author at: Laboratory of Host-Pathogen Interactions-UBM, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. *E-mail address:* robello@pasteur.edu.uy (C. Robello).

amplified at least 100 times (*e.g.* in the Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit protocol), and for Illumina NGS library preparation, an amplification step with few cycles is also needed (*e.g.* 15 cycles for TruSeq RNA protocol).

In order to address the possible impact of cross-contamination of cells used to propagate the pathogen in transcriptome host-pathogen interaction studies, in this work we analyzed mammalian cells infected with *T. cruzi*, after using Vero cells to propagate the parasite. We demonstrate that contamination exists and that it can generate false positive results in qRT-PCR and microarray experiments of human cells infected with VDT. Additionally, we compared six different purification protocols of VDT in order to determine which protocol minimizes RNA contamination. Finally, in order to understand the impact of this contamination in the context of Illumina RNA-Seq data, we calculated pairwise-sequence divergences between human and Vero (*C. sabaeus*) genomes, as well as additional target mammalian species (other primates, rodents, rabbits and a marsupial) that could alternatively be used to propagate trypomastigotes.

#### 2. Methods

#### 2.1. Vero cell-derived trypomastigotes

Six different protocols to purify trypomastigotes were used. In all cases, trypomastigotes were collected from supernatants of infected monolayers of Vero cells:

*P1* - *Cell pre-centrifugation:* trypomastigotes were separated from cellular debris by low speed centrifugation (500 × g) for 10 min. Then, the parasites were isolated from the supernatant by a second centrifugation at 1500 × g *for 10* min.

*P2 - Swimming up:* trypomastigotes were pelleted by centrifugation (1000  $\times$  *g*, 10 min) and collected from the supernatant after swimming up from the pellet over 2–4 h at 37 °C.

*P3* - One wash: trypomastigotes were collected by centrifugation at 1500  $\times$  g for 10 min and washed once with PBS.

*P4* - *Three washes*: parasites were centrifuged at 1500  $\times$  *g* for 10 min and washed three times with PBS.

*P5* - *Filtered*: the parasites were filtered through a 3  $\mu$ m pore size membrane *(Millipore)*. The collected fraction was centrifuged at 1500 × g for 10 min.

*P6* - *No wash:* trypomastigotes were collected from supernatants of infected monolayers of Vero cells and centrifuged at 1500  $\times g$  for 10 min.

In all the protocols, after the final centrifugation the parasites were resuspended in Human Cardiomyocyte Cell Culture Medium (*Celprogen*).

#### 2.1.1. Cell culture infection assays

Human primary cardiomyocytes (HPC) (*Celprogen*) derived from adult cardiac tissue were grown in Human Cardiomyocyte Cell Culture Medium (*Celprogen*) supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (*Gibco-BRL*) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Semi-confluent cardiomyocytes were infected with Dm28c VDT (produced following protocols P1 to P6) at a ratio of ten parasites per cell in cardiomyocyte medium without FBS, centrifuged for 1 min at 500 × g to facilitate interaction, and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 1, 5, 10, 15 and 30 min. Infections were washed with PBS, and RNA extraction was performed with the Direct-zol RNA Miniprep kit (*ZYMO RESEA-RCH*). In some cases, infections were incubated for 2 h, and non-internalized parasites were removed by two PBS washes and fresh Human Cardiomyocyte Cell Culture Medium supplemented with 10% (v/v) FBS was added. 24 h post infection (hpi) cells were washed with PBS and RNA extraction was performed.

#### 2.2. qRT-PCR

cDNA was synthesized by reverse transcription using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) with Oligo(dT) primers and 250 ng of total RNA was added as a template. qRT-PCR reactions were performed using 5  $\mu$ L SybrGreen (KAPA SYBR FAST Universal 2imesqRT-PCR Master Mix, KapaBiosystems), 200 nM of forward and reverse primers, and 1 µL of a 1/5th dilution of cDNA, in a final volume of 10 µL. Samples were analyzed in duplicate in an Eco gRT-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 melting curves were analyzed to ensure that the desired amplicon was being detected and to discard the possibility of contaminating DNA and primer dimers. In addition, agarose gel electrophoresis and Sanger sequencing were done to confirm the expected PCR product. The threshold cycle (Ct) value for each gene was normalized to GAPDH in human samples and to Thioredoxin (TRX) in *T. cruzi* samples, calculating the  $\Delta$ Ct for each gene in all samples (two to three replicates in each case). The comparative Ct method ( $\Delta\Delta$ Ct method) was used to determine the relative quantity of the target genes, and the expression fold change was calculated as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [18]. Primer sequences are listed in Supp. Table 1.

#### 2.3. Sequence alignments

To study the similarity between human and *C. sabaeus* transcripts for *gas5* and *atf4* genes, we used the sequences NM\_001675.4 (*atf4*) and NR\_002578.3 (*gas5*) as queries for a BLASTN search [19,20] through the available nucleotide collection database for *C. sabaeus*. BLASTN parameters were maintained by default. The probes for the genes, defined in the Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray (*Agilent*) (A\_32\_P230828, A\_24\_P765053 and A\_32\_P307211 for *gas5* and A\_23\_P120933, A\_32\_P187851 and A\_23\_P120941 for *atf4*) were also searched in the *C. sabaeus* genome with BLASTN (default settings). The human and *C. sabaeus* gas5 sequences (NR\_002578.3 and XR\_496592.1, respectively) together with the *gas5* sequence amplified from infected HPC samples, were aligned with CLUSTALW [21] with default parameters.

To study putative cross-hybridization between microarray probes and the Vero cell RNAs, the Agilent probes (60 nt length) present in the Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray (*Agilent*) and the Affymetrix probes (25 nt lenght) present in the HG-U133\_Plus 2.0 array were aligned with bowtie v1.2.2 [22] to a composite genome index of both human and green monkey references downloaded from Ensembl release 98 [23]. The aligner was run allowing for up to 2 mismatches (-v 2) in the case of Agilent probes, and 0 mismatch (-v 0) in the case of Affymetrix probes, and reporting all primary and secondary alignments up to a maximum of 50 alignments per read (-a -m 50). The remaining parameters were maintained by default. Given the SAM output file, a custom perl script was used to classify the reads into three categories: those aligning only to the human genome, those aligning only to the *C. sabaeus* genome and those being mapped to both genomes.

#### 2.4. Pairwise-divergence estimation

Pairwise divergences were estimated between human (as the reference sequence) and the following mammalian species: chimpanzee, baboon, rhesus macaque, green monkey, marmoset, mouse, rat, chinese hamster, guinea pig, rabbit and opposum (Supp. Table 2). Wholegenome pairwise alignments where downloaded from Ensembl Compara version 96 [24] as well as human gene annotation files. Ensembl alignments are produced by alignment with LASTZ [25] and post-processing of raw results by chaining of the original blocks according to their location in both genomes. Then, a final netting process is executed for selecting the best sub-chain in each region for the human reference [24–26]. MafFilter version 1.3.1 [27] was used to filter the pairwise alignments and to calculate the divergence for each final homologous block. The sequentially implemented filters and operations consisted of: keep only alignment blocks that are homologous to the human genes (given the Ensembl v96 human gene annotation); keep alignment blocks that are longer than 250 nt; split blocks into 100 nt windows; calculate pairwise divergence (percentage of observed mismatches) for each final window. The specific window size was chosen because 100 nt is a standard length for transcriptomic reads obtained by Illumina sequencing. Summary statistics and plots of divergence distribution were calculated for random samples of 10,000 windows per chromosome and per species pair using the R environment [28]. All core human chromosomes were used in pairwise comparison to chimpanzee while for the other taxa, only chromosome 1 and chromosome X were assessed.

#### 2.5. Statistical analysis

Statistical significance between two groups was estimated using the unpaired Student's *t*-test. Statistical significance was assumed with probability values less than or equal to 0.05.

#### 3. Results

#### 3.1. Evidence of RNA cross-contamination

To study whether Vero cDNAs could hybridize to the human microarray probes (Human Gene Expression 8x60K v2 Agilent Microarray), we aligned the probes to a composite *H. sapiens* and *C. sabaeus* genome. We found that around 38% of the probes in the array align to both human and *C. sabaeus* genome, indicating that cross-hybridization is possible and, if Vero-derived RNA contamination happens, it could produce spurious results in the transcriptomic profiling. In a previous work we reported a microarray analysis of *T. cruzi*-

infected HPC using the Agilent human array 8x60K\_v2 [29]. Based on this microarray dataset, we chose two genes, the transcription factor *atf4* and the long non-coding RNA *gas5*, to check for the presence of cross-contamination. Both genes were inferred as differentially expressed between infected and non-infected HPC samples. As shown in Table 1, the microarray includes three probes for each *gas5* and *atf4* genes. Two of the three probes for *gas5* are specific for the human gene while the other shows 95% of identity with the ortholog in *C. sabaeus*. The three probes for *atf4* share between 93 and 97% identity with *C. sabaeus* ortholog. In each case, only one probe was determined as differentially expressed, being the ones with the highest identity to the Vero (*C. sabaeus*) orthologs.

To assess whether the differential expression of *gas5* and *atf4* constituted a false positive result, we studied RNA levels for *gas5* and *atf4* genes in Vero cells, VDT extracts and in control and infected HPC cells at very early times post-infection (1, 5, 10, 15 and 30 min), using primers able to amplify the transcripts from both species, *Homo sapiens* and *C. sabaeus* (GAS5 and ATF4 H&V primers, Supp. Table 1). We found that transcripts from these genes were detectable not only in infected HPC (Fig. 1A) but also in Vero cells and VDT extracts (Fig. 1B). They were not expressed either in non-infected HPC or in axenic epimastigotes.

Using a BLASTN search (with the gas5 NR\_002578.3 and the atf4 NM\_001675.4 transcripts), we identified the atf4 and gas5 *C. sabaeus* orthologs. By comparing the human and the *C. sabaeus* transcript sequences, we found that the first 795 bp of atf4 gene are absent in the *C. sabaeus* gene annotation. Meanwhile, all four *C. sabaeus* gas5 annotated transcripts share a missing fragment shorter than 60 bp. These differences allowed us to design new human specific atf4 and gas5 primers (ATF4 H and GAS5 H, Supp. Table 1). We also designed gas5 primers able to amplify these different 60 bp fragments in both species (GAS5 574, Supp. Table 1).

We found that while the H&V primers amplified the genes in the infected cardiomyocytes, the human-specific primers did not, as shown

#### Table 1

GAS5 and ATF4 probes in the Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray (Agilent).

Probe name/ Reference sequence	Human (H) probe Sequence (60bp) alignment to <i>C. sabaeus</i> (V)	Aligns with <i>C. sabaeus?</i> (% Identity)
GAS5		
>A_32_P230828 */ NR_002578.3	H CTAACTCAAGCCATTGGCA <mark>C</mark> ACAGGCATTAGACAGAAA <mark>G</mark> CT-GAAGTTGAAATGGTGGAGT 	Yes (95%)
> A_32_P307211/ NR_037605	ATGCTTACAGCTAATGAACAGATGAAAAGCACTGTCCTTTTTTAAGTAAACACTACACAC	No
> A_24_P765053/ ENST00000451607	AACCGCTCTGATGGTGGCACATGCCGAGTCACCCGAGTAAGCTATTGTTAAGGGCCGTGA	No
ATF4		
A_23_P120933 * / NM_001675.4	H CAAGGCAAGGGGGAAGAAAAGGGTCCCCTAGTTGAGG <b>A</b> TAGTCAGGAGCGTCA <b>A</b> TGTGCT 	Yes (97%)
A_23_P120941/ NM_001675	H CAAGGCAAGGGGGAAGAAAAGGGTCCCCTAGTTGAGGATAGTCAGGAGCGTCAATGTGCT 	Yes (97%)
A_32_P187851/ CU680155	H TACTTTTGCT <mark>G</mark> CTACCATCTTCTCTCCAGGAGG <b>A</b> TCGTAAGGTTTGGG <b>A</b> CGGGCAGA <mark>C</mark> CC 	Yes (93%)

\*Denote the probes that appear as over-expressed in the infected HPC experiment.



**Fig. 1.** Expression of *gas5* and *atf4* genes in HPC, Vero and VDT. A. Relative quantification using RT-qPCR of *gas5* and *atf4* transcripts with H&V primers at different times post-infection (1, 5, 10, 15 and 30 min) in infected human primary cardiomyocytes (HPC) relative to the control at 30 min. GAPDH was used as housekeeping gene. Values are means of two or three biological replicates  $\pm$  SEM. \* $p \leq .05$ . B. Relative quantification using RT-qPCR of *gas5* and *atf4* transcripts with H&V primers in VDT (relative to epimatigotes-EPI) and in Vero cells (relative to non-infected cardiomyocytes -Ctrl). GAPDH and TRX were used as housekeeping genes for human and *T. cruzi* samples, respectively. Values are means of two or three biological replicates  $\pm$  SEM. \* $p \leq .05$ . C. Melting curve analysis of *gas5* and *atf4* transcripts from infected HPC amplified with GAS5 and ATF4 H&V primers (blue and green curves respectively), and with specific primers for human *gas5* and *atf4* genes (GAS5 H and ATF4 H, orange and violet curves respectively). NTC: No template control. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

by the melting curve analysis (Fig. 1C). As a positive control, we amplified both genes in human fibroblast cells (HFF) using H primers (Supp. Fig. 1A). By using the GAS5 574 primers, we showed that the *gas5* 60 bp shorter transcript is detected in infected HPC (Supp. Fig. 2). These results confirmed that the *gas5* and *atf4* transcripts that had been found as differentially expressed in infected HPC actually derive from Vero cells.

#### 3.2. Comparison of different protocols for trypomastigotes purification

In order to avoid or minimize RNA cross-contamination, we compared six different commonly used T. cruzi purification protocols, through the determination of Vero (C. sabaeus) gas5 and atf4 RNA levels. The highest RNA levels were found in VDT purified using the protocol P6, followed by P3 and P4. The lower RNA levels were found in VDT purified using protocols P1, P2 and P5. It is worth emphasizing that none of the protocols were able to prevent the amplification of both genes (Fig. 2A and Table 2). Gene amplification was not detected when the human-specific primers for gas5 and atf4 were employed (Supp. Fig. 1B). When HPC were infected with VDT coming from the different protocols, we found that with P3, P4 and P6, both genes were detected in the infected HPC 24 hpi. With P1, P2 and P5 we did not found differential expression in respect to the control sample (Fig. 2B). Additionally, we evaluated the percentage of trypomastigote recovery per protocol (Table 2). For P1 and P2 the recovery was around 10%, for P4 it was below 30%, whereas for the remaining protocols (P3, P5 and P6) the recovery was above 50%. Looking at the contamination ratio (mean % of VDT recovery divided the mean GAS5 and ATF4 quantification) the P5 protocol shows the best ratio.

Finally, we studied whether Vero contamination in VDT changed depending on the day that trypomastigotes were collected from supernatants of infected monolayers of Vero cells. We purified VDT on the first day that we observed trypomastigotes in the supernatant and in the following five days. Half of the VDT were purified with the P5 protocol and the other half using P6. When we analyzed the relative quantification of the *gas5* and *atf4* genes, we always found that they were more abundant when the P6 protocol was used, as shown in Fig. 2A. The highest expression level for both genes was detected on the first day of the trypomastigote collection (Fig. 2C).

#### 3.3. Pairwise divergence and its impact on transcriptomic studies

Cell lines derived from primates of the Cercopithecidae family (like Vero – *C. sabaeus*- and LLCMK2 –*Macaca mulatta*- cells) are normally used to propagate trypomastigotes [5], but the genome sequence similarity between these species can lead to difficulties in discriminating between RNAs coming from human or from the contaminating cell line. As expected, given the comparative genomics data available (Supp. Table 2.1), the production of trypomastigotes in cell lines derived from taxa not so closely related to human would reduce the chances of having a confounding effect as a consequence of contaminated trypomastigote extracts. For example, identity in coding regions drops from 96% to 82–84% when the pairwise comparison involves a rodent instead of a primate taxon as *C. sabaeus* (Supp. Table 2.1).



**Fig. 2.** Evaluation of *gas5* and *atf4* presence in VDT and in infected HPC after trypomastigote collection following protocols P1 to P6. A. Relative quantification using RT-qPCR of *gas5* and *atf4* transcripts with the H&V primers in P1–P6 VDT. The results were expressed in relation to the axenic epimastigote extract. TRX was used as the housekeeping gene. Values are means of two or three biological replicates  $\pm$  SEM. \*  $p \le .05$ . B. Relative quantification using RT-qPCR of *gas5* and *atf4* transcripts with the H&V primers in HPC infected with P1–P6 VDT 24hpi (INF P1–P6). The results were expressed relative to non infected cardiomicocytes (Ctrl). Values are means of two or three biological replicates  $\pm$  SEM. \* $p \le .05$ . C. Relative quantification using RT-qPCR of *gas5* and *atf4* transcripts with H&V primers in VDT extracts purified following the P5 and P6 protocols at days 1, 2, 3, 4 and 6 after trypomastigotes were observed in the supernatant for the first time. The results were expressed in percentage, in relation to the P5-1 sample. Values are means of two or three biological replicates  $\pm$  SEM. \* $p \le .05$ , significant change of P6 vs P5 at the different days post VDT collection.

#### Table 2

Relative quantification of *gas5* and *atf4* transcripts in P1-P6 VDT and percentage of VDT recovery. The relative quantification of the *gas5* and *atf4* transcripts amplified with the H&V primers, obtained with the different protocols relative to epimastigote samples was done by qRT-PCR. In all the cases the mean  $\pm$  SEM between two or four replicates were analyzed. The mean percentage of VDT recovery obtained with the different protocols was calculated. The contamination ratio was calculated as the mean % of VDT recovery divided by the mean GAS5 and ATF4 quantification.

Protocol	GAS5 quantification in VDT	ATF4 quantification in VDT	Mean % of VDT recovery	Contamination ratio
Epi P1 P2 P3 P4 P5 P6	$\begin{array}{c} 1.0 \pm 0.2 \\ 12.0 \pm 0.7 \\ 21.0 \pm 2.8 \\ 74.0 \pm 2.8 \\ 43.5 \pm 1.8 \\ 22.5 \pm 5.3 \\ 77.2 \pm 2.0 \end{array}$	$\begin{array}{r} 1.0 \pm 0.1 \\ 46.0 \pm 2.1 \\ 89.5 \pm 4.6 \\ 489.0 \pm 72.8 \\ 379.0 \pm 56.6 \\ 100.0 \pm 23.3 \\ 632.5 \pm 26.5 \end{array}$	$\begin{array}{c} - \\ 11.1 \pm 1.6 \\ 8.9 \pm 0.3 \\ 50.4 \pm 1.9 \\ 29.7 \pm 0.6 \\ 54.5 \pm 1.8 \\ 81.4 \pm 1 \end{array}$	$\begin{array}{c} - \\ 0.38 \pm 0.09 \\ 0.16 \pm 0.03 \\ 0.18 \pm 0.05 \\ 0.14 \pm 0.04 \\ 0.89 \pm 0.44 \\ 0.23 \pm 0.02 \end{array}$

Nowadays, Illumina sequencing is the most frequent technology used for the production of high-throughput transcriptomic data. To better quantify the putative impact in RNA-seq data introduced by the organisms where the trypomastigotes were grown, we estimated the mean and dispersion values of pairwise divergence between human and several mammalian species for chromosome X and chromosome 1 (Supp. Table 2.1), as well as the percentage of sampled windows where the observed divergence was less than or equal to two (see Materials and Methods). We chose this value because it is often used when Illumina transcriptomic reads are mapped to the human genome reference (e.g. bowtie -v 2), meaning that these sequences could be incorrectly aligned to the human genome contributing to false positive results. We selected chromosome X because it is known to be well conserved through different mammalian lineages [30-33] and the same can be inferred from our analysis of all chromosomes for humanchimpanzee pairwise alignments (Fig. 3A and Supp. Table 2.2). We found that the mean pairwise divergence is about 5% between human and cercopithecinae primates and increases to about 10% when the comparison involves the marmoset. In the case of rodents and rabbit, it increases between 22 and 28% and it rises to 30% with the opossum (Supp. Table 2.3). Fig. 3B shows the probability density of divergence values for all the chromosome X sampled windows analyzed. For cercopithecinae species there is about a 13% of windows with zero to two pairwise differences to the human reference sequence which cannot be ignored (Supp. Table 2.3). As previously mentioned, these sequences would not be distinguishable from human sequences. Similar results were obtained when human chromosome 1 was used as reference (Supp. Table 2.4 and Supp. Fig. 2B).

An estimation of gene profiling studies that could be affected by RNA contamination, and interfere with downstream transcriptomics analysis (microarrays, NGS, or qRT-PCR), is shown in Table 3. As mentioned, we found that around 38% of the probes present in the 8x60K v2 Agilent Microarray, align to both human and *C. sabaeus* genome. In the case of Affymetrix microarrays, we took the HG-U133\_Plus 2.0 array as an example, and we found that 32,83% of the probes align to both genomes (human and *C. sabaeus*), indicating that



Fig. 3. Pairwise divergence estimation. A. Boxplots summarize per chromosome the distribution of estimated human-chimpanzee pairwise divergence values for 10,000 random windows sampled from coding regions in human-chimpanzee whole-genome alignments. B. Violin plots show, per target species, the probability density of estimated pairwise divergence values for 10,000 random windows sampled from aligned coding regions to human chromosome X. The vertical blue line highlights divergence equal 2 (the divergence is estimated as a percentage but the windows are 100 nt long, thus divergence and percentage of divergence are equivalent). PANU: *Papio anubis*; MMUL: *Macaca mulatta*; CSAB: *Chlorocebus. sabaeus*; CJAC: *Callithrix jacchus*; MMUS: *Mus musculus*; RNOR: *Rattus norvergicus*; CGRI: *Cricetulus griseus*; CPOR: *Cavia porcellus*; OCUN: *Oryctolagus cuniculus*; MDOM: *Monodelphis domestica*. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

cross-hybridization is possible in both cases.

#### 4. Discussion

Transcriptome analysis are a common approach to investigate hostpathogen interactions in infectious diseases. When the pathogen is an intracellular microorganism, it usually involves an initial method to propagate the pathogen (*via* cell culture or animal models), and the subsequent co-cultures, using the host cell of interest. When this is the case, the cells used to produce the pathogen can be a source of crosscontamination. *T. cruzi* infection constitutes an appropriate model to investigate this because it has a life cycle with a mammalian intracellular stage. We first demonstrated that this type of contamination produced false positive results in a human microarray experiment where HPC were infected with VDT. We showed that the microarray probes are not human specific, allowing the hybridization of cDNA from related taxa such as *C. sabaeus* (Table 1). After the design of specific human primers, we also demonstrated that the *atf4* and *gas5* RNAs expression detected in infected HPC and VDT extracts is explained by transcription of Vero RNAs instead of having a human origin (Fig. 1). Besides, neither gene was amplified using H&V primers from epimastigotes, as is expected as no ortholog for these genes was found in the *T. cruzi* genome. All these results confirm cross-contamination with Vero cells in VDT and infected HPC samples.

Analyzing six different commonly used VDT purification protocols, we found that none of them was able to eliminate Vero contamination

#### Table 3

Number of possible articles affected by the RNA contamination coming from the cell line used to propagate the parasite.

Transcriptomic assay	Number of papers	Cell line used to propagate the trypomastigotes/host cell analyzed / Reference
Agilent Microarray Platform	3	Vero cells/human HeLa cells/[34]
		Vero cells/human placenta cells/[35]
		Vero cells/human cardiomyocytes/[29]
Affymetrix Microarray Platform	1	LLcMK <sub>2</sub> (M. mulatta)/human fibroblast, endothelial and smooth muscle cells/[36].
Custom human cDNA Microarray	2	L <sub>6</sub> E <sub>9</sub> rat myoblast/L <sub>6</sub> E <sub>9</sub> rat myoblast/[37]
		L <sub>6</sub> E <sub>9</sub> rat myoblasts/myocytes from neonatal mouse/[38]
Illumina sequencing	3	LLcMK <sub>2</sub> (M. mulatta)/human fibroblast/[15]
		Vero cells/human fibroblast/[14]
		LLcMK <sub>2</sub> ( <i>M. mulatta</i> )/human fibroblast/[16]
qRT-PCR	2	Human macrophages THP-1/human macrophages THP-1/[39].
		Vero cells/human astrocytoma cell/[40].

from the VDT extract (Fig. 2A). This highlights that this contamination could occur in most of the experiments done with this T. cruzi model. The purification protocol P5 involves the filtration of the Vero infected supernatant with the trypomastigotes through a 3 µm pore filter and the collection of the trypomastigotes by centrifugation. This protocol is commonly used to purify the intracellular parasite Toxoplasma gondii [41], and is able to eliminate most of the cell debris from the parasite extract. Considering that the P5 protocol is a straightforward method, with a relative high trypomastigote recovery and that Vero-derived RNAs were not detected in HPC infected with this VDT (Fig. 2B), we propose it as the most appropriate alternative to purify cell-derived trypomastigotes. One aspect that we want to highlight is that the highest level of contamination with Vero cells in VDT was found on the first day of the trypomastigote collection (Fig. 2C). This sample corresponds to a culture without washes in the previous 4-5 days (the time that it takes to liberate the trypomastigotes), which will facilitate the accumulation of Vero RNAs and cells debris in the supernatant.

The most used cell lines to propagate trypomastigotes are derived from primates: Vero (C. sabaeus) and LLCMK2 (M. mulatta) [5]. However, rodent derived cell lines were also used to propagate T. cruzi (as the CHO cells derived from C. griseus), and mice are widely used for in vivo T. cruzi infections. Rabbits (O. cuniculus) can also be infected by T. cruzi [42], as well as the marsupial M. domestica (opossum). In fact, marsupials are considered the earliest hosts of T. cruzi [43]. As expected, sequence divergence to human is higher among non-primate mammals, thus we recommend propagating trypomastigotes in nonprimate cell types (Supp. Table 2.1). As shown before, in the case of cell RNA contamination during the purification of the infective parasites, the chances of observing spurious hybridization or alignments are minimized to almost zero if the trypomastigotes are propagated in rodents, rabbits or opposum (Fig. 3B and Supp. Table 2.3). It is important to consider that the estimated mean pairwise divergence between human and the analyzed species are conservative values, as the size of recognizable homologous sequence declines as we increase the evolutionary distance to human, our reference sequence. Depending on several factors such as contamination level, sequencing errors, human polymorphisms, gene features and alignment strategies, these spurious alignments will cause perturbations on the estimated human expression profile. Independent of the high-throughput transcriptome profiling technique, the introduced bias will be gene dependent: it would be maximum for those genes that are highly conserved and lowly expressed in the studied human cell but highly expressed in the other primates. As we showed, this was the case for gas5 and atf4 genes, which appear to be highly expressed in Vero cells and almost not expressed in HPC cells.

We suggest to analyze the putative impact of cross-contamination, especially in those cases where the pathogen has a narrow host range and using alternative taxa for propagation is not an option. In the case of microarrays, probe ambiguity could be assessed by their alignment to the host and the species used to grow the microorganism, excluding those probes and genes which might be affected with contaminationdriven hybridization from further analysis. In the case of RNA-Seq data, we recommend the generation of hybrid reference genomes (i.e. in our work the reference genome should be a composite of human and C. sabaeus genome) and the classification of sequence reads as having an unambiguous human origin (i.e. those reads that can be mapped only in the human genome) or not (i.e. those reads that can be mapped to both or uniquely to the C. sabaeus genome). This proposed additional quality control step in the RNA-Seq analysis pipeline does not imply an increase in the total computational cost of the study and would be enough to avoid biased results. With qRT-PCR experiments, (where 35-40 amplification cycles are done) special attention must be paid to primer design, to avoid identical or very similar conserved sequences between species.

As final considerations, first we want to stand out the necessity to perform functional analysis to validate transcriptomic data, because

these are the irrefutable and final way to validate a biological pathway inferred by gene profiling assays. As an example, in a previous work we found the overexpression of genes related to mitochondrial respiration in human cardiomyocytes infected with T. cruzi, and these results were validated through determination of oxygen consumption rates among infected and control cardiomyocytes [29]. Second, this carry-over effect can also affect proteomics studies, and the conclusions of this work should be taken into account in proteomics experiments involving hostpathogen interactions. For example, if the high stability of the ncRNA gas5 is explained because it is part of a ribonucleoprotein complex or exosomes (see below), then these proteins will appear as contaminants, with the aggravating factor that when comparing species, differences at the amino acid level will be lower than their nucleotide counterpart. For example, ortholog proteins in human and chimpanzee are extremely similar, with  $\sim$ 29% being identical and the typical ortholog differing by only two amino acids, one per lineage [44]. Finally, we want to highlight that Vero cells are not only used to propagate obligate intracellular parasites (e.g.: T.cruzi, T. gondii, and Neospora caninum), bacteria (e.g.: Coxiella and Brucella) or viruses, but they are also a platform for inactivated whole virus vaccine production, such as yellow fever, rabies virus, H1N1 and polio virus, among others [45]. In the case of the Yellow Fever Virus, it is produced in Vero cells and the virus suspension is first filtered through a combination of different filters (8, 3, 0.45 and 0.2  $\mu$ m) to eliminate cells, previous to the virus purification [46]. In the case of the rabies virus, the virus suspension is filtered on a 0.45 µm pore [47]. After the virus purification, there are regulatory requirements of the World Health Organization (WHO), for residual DNA and proteins coming from host cells, but no specifications are established for detection and management of residual RNAs [48,49], even thought some RNA species can have undesirable effects, including lncRNAs [50], miRNA [51] or circRNAs [52]. These type of RNAs could be secreted by Vero cells in free from, as part of ribonucleoproteins, or in microvesicles with a size smaller than  $0.2 \,\mu\text{m}$  like exosomes [53,54], where RNAs are protected from RNAses degradation [55]. All of this data should be taken into account to consider the presence of RNAs in the final vaccine formulations with inactivated whole viruses coming from Vero or other cell lines.

#### 5. Conclusions

Different types of cell lines are widely used for the production of intracellular microorganisms. In this work we have shown, using *T. cruzi* infection as a model, that the contamination with RNA coming from Vero cells can be an underestimated problem in transcriptome host-pathogen interaction studies. Special attention should definitely be paid in the experimental design and analysis pipeline, depending on the method used for transcriptome profiling (qRT-PCR, microarray or Illumina RNA-Seq). We propose a VDT purification protocol that minimizes contamination of the host cell of interest and we highlight the importance of determining an appropriate purification method for each infection model.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103804.

#### **Declaration of Competing Iinterest**

Authors declare no conflict of interests.

#### Acknowledgements

This work was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación(UY) DCI-ALA/2011/023–502, 'Contrato de apoyo a las políticas de innovación y cohesión territorial', Fondo para la Convergencia Estructural del Mercado Común del Sur(FOCEM) 03/11, and by Research Council United Kingdom Grand Challenges Research Funder 'A Global Network for Neglected Tropical Diseases' grant number MR/P027989/1. FDV has a ANII doctoral fellowship (No. POS\_NAC\_2016\_1\_129916). MGL and CR are members of the Sistema Nacional de Investigadores (SNI-ANII, UY).

#### References

- N. Osada, et al., The genome landscape of the african green monkey kidney-derived vero cell line, DNA Res. 21 (6) (2014) 673–683.
- [2] N.C. Ammerman, M. Beier-Sexton, A.F. Azad, Growth and maintenance of Vero cell lines, Curr. Protoc. Microbiol. (2008) Appendix 4: p. Appendix 4E.
- [3] A.F. Rodrigues, et al., Viral vaccines and their manufacturing cell substrates: new trends and designs in modern vaccinology, Biotechnol. J. 10 (9) (2015) 1329–1344.
  [4] W. Hu, et al., A Vero-cell-adapted vaccine donor strain of influenza A virus gen-
- [4] W. Hu, et al., A Vero-cell-adapted vaccine donor strain of influenza A virus generated by serial passages, Vaccine 33 (2) (2015) 374–381.
  [5] G.A. Duran-Rehbein, et al., Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma*
- *cruzi* infection: a review of the published literature, Parasite 21 (2014) 38.
- [6] P.C. Teixeira, et al., Selective decrease of components of the creatine kinase system and ATP synthase complex in chronic Chagas disease cardiomyopathy, PLoS Negl. Trop. Dis. 5 (6) (2011) e1205.
- [7] X. Wan, et al., Defects of mtDNA replication impaired mitochondrial biogenesis during *Trypanosoma cruzi* infection in human cardiomyocytes and chagasic patients: the role of Nrf1/2 and antioxidant response, J. Am. Heart Assoc. 1 (6) (2012) e003855.
- [8] M.L. Chiribao, et al., Cloning, localization and differential expression of the *Trypanosoma cruzi* TcOGNT-2 glycosyl transferase, Gene 498 (2) (2012) 147–154.
- [9] E. Cunha-Neto, et al., Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy, Am. J. Pathol. 167 (2) (2005) 305–313.
- [10] S. Mukherjee, et al., Alterations in myocardial gene expression associated with experimental *Trypanosoma cruzi* infection, Genomics 91 (5) (2008) 423–432.
- [11] P.N. Nde, et al., Gene network analysis during early infection of human coronary artery smooth muscle cells by *Trypanosoma cruzi* and its gp83 ligand, Chem. Biodivers. 7 (5) (2010) 1051–1064.
- [12] P.A. Manque, et al., *Trypanosoma cruzi* infection induces a global host cell response in cardiomyocytes, Infect. Immun. 79 (5) (2011) 1855–1862.
- [13] A.F. Henao-Martinez, et al., AKT network of genes and impaired myocardial contractility during murine acute Chagasic myocarditis, Am. J. Trop. Med. Hyg. 92 (3) (2015) 523–529.
- [14] G.A. Houston-Ludlam, A.T. Belew, N.M. El-Sayed, Comparative transcriptome profiling of human foreskin fibroblasts infected with the sylvio and Y strains of *Trypanosoma cruzi*, PLoS One 11 (8) (2016) e0159197.
- [15] Y. Li, et al., Transcriptome remodeling in *Trypanosoma cruzi* and human cells during intracellular infection, PLoS Pathog. 12 (4) (2016) e1005511.
- [16] A.T. Belew, et al., Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection, PLoS Pathog. 13 (12) (2017) e1006767.
- [17] H. Shen, S. Rogelj, T.L. Kieft, Sensitive, real-time PCR detects low-levels of contamination by *Legionella pneumophila* in commercial reagents, Mol. Cell. Probes 20 (3–4) (2006) 147–153.
- [18] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method, Methods 25 (4) (2001) 402–408.
- [19] S.F. Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215 (3) (1990) 403–410.
- [20] C. Camacho, et al., BLAST+: architecture and applications, BMC Bioinf. 10 (2009) 421.
- [21] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22 (22) (1994) 4673–4680.
- [22] B. Langmead, et al., Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, Genome Biol. 10 (3) (2009) R25.
- [23] D.R. Zerbino, et al., Ensembl 2018, Nucleic Acids Res. 46 (D1) (2018) D754–D761.
  [24] J.E.A. Herrero, Ensembl comparative genomics resources, Database (Oxford) 2016
- (2016) baw053.[25] R.S. Harris, Improved Pairwise Alignment of Genomic DNA, The Pennsylvania State University, 2007.
- [26] W.J. Kent, et al., Evolution's cauldron: duplication, deletion, and rearrangement in the mouse and human genomes, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (20) (2003)

11484–11489.

- [27] J.Y. Dutheil, S. Gaillard, E.H. Stukenbrock, MafFilter: a highly flexible and extensible multiple genome alignment files processor, BMC Genomics 15 (2014) 53.
   [28] RCoreTeam, R: A Language and Environment for Statistical Computing, Available
- from: http://www.R-project.org, (2008) http://www.r-project.org./>.
- [29] M.G. Libisch, Early *Trypanosoma cruzi* infection triggers mTORC1-mediated respiration increase and mitochondrial biogenesis in human primary cardiomyocytes, Front. Microbiol. 9 (2018) 1889.
- [30] J.M. Watson, et al., The X chromosome of monotremes shares a highly conserved region with the eutherian and marsupial X chromosomes despite the absence of X chromosome inactivation, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87 (18) (1990) 7125–7129.
- [31] W.J. Murphy, et al., Dynamics of mammalian chromosome evolution inferred from multispecies comparative maps, Science 309 (5734) (2005) 613–617.
- [32] C.L. Delgado, et al., Physical mapping of the elephant X chromosome: conservation of gene order over 105 million years, Chromosom. Res. 17 (7) (2009) 917–926.
- [33] J. Macha, et al., Deep ancestry of mammalian X chromosome revealed by comparison with the basal tetrapod Xenopus tropicalis, BMC Genomics 13 (2012) 315.
- [34] M.L. Chiribao, et al., Early *Trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells, Biomed. Res. Int. 2014 (2014) 439501.
- [35] C. Castillo, et al., Host-parasite interaction: changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*, Parasit. Vectors 11 (1) (2018) 479.
- [36] J.A. Costales, J.P. Daily, 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 10 (2009) 252.
- [37] D. Adesse, et al., Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*, Am. J. Trop. Med. Hyg. 82 (5) (2010) 846–854.
- [38] R.C. Goldenberg, et al., Transcriptomic alterations in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes, Microbes Infect. 11 (14–15) (2009) 1140–1149.
- [39] J. Tellez, et al., Drug transporter and oxidative stress gene expression in human macrophages infected with benznidazole-sensitive and naturally benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites treated with benznidazole, Parasit. Vectors 12 (1) (2019) 262.
- [40] A.R. Vargas-Zmbrano, A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with *Trypanosoma cruzi*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz (2013) 108(2).
- [41] R.J. Dahl, A.M. Johnson, Purification of toxoplasma gondil from host cells, J. Clin. Pathol. 36 (5) (1983) 602–604.
- [42] C. Botto-Mahan, et al., European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) are naturally infected with different *Trypanosoma cruzi* genotypes, Am. J. Trop. Med. Hyg. 80 (6) (2009) 944–946.
- [43] N.C. Woody, H.B. Woody, American trypanosomiasis. I. Clinical and epidemiologic background of Chagas' disease in the United States, J. Pediatr. 58 (1961) 568–580.
- [44] S. Chimpanzee, C. Analysis, Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome, Nature 437 (7055) (2005) 69–87.
- [45] P.N. Barrett, et al., Vero cell technology for rapid development of inactivated whole virus vaccines for emerging viral diseases, Expert Rev. Vacc. 16 (9) (2017) 883–894.
- [46] T.P. Pato, et al., Purification of yellow fever virus produced in Vero cells for inactivated vaccine manufacture, Vaccine 37 (24) (2019) 3214–3220.
  [47] K. Trabelsi, M. Ben Zakour, H. Kallel, Purification of rabies virus produced in Vero
- [47] K. Trabelsi, M. Ben Zakour, H. Kallel, Purification of rabies virus produced in Vero cells grown in serum free medium, Vaccine 37 (47) (2019) 7052–7060.
- [48] WHO, Study Group on Cell Substrates for Production of Biologicals, Available from: http://www.who.int/biologicals/publications/meetings/areas/vaccines/cells/ Cells.FINAL.MtgRep.IK.26\_Sep\_07.pdf?ua=1>.
- [49] WHO, Evaluation of cell substrates for the production of biologicals: revision of WHO recommendations, in: W.H. Organizaiton (Ed.), Report of the WHO Study Group on Cell Substrates for the Production of Biologicals, WHO, 2009.
- [50] H. Do, W. Kim, Roles of oncogenic long non-coding RNAs in cancer development, Genom. Inform. 16 (4) (2018) e18.
- [51] T. Frixa, S. Donzelli, G. Blandino, Oncogenic MicroRNAs: key players in malignant transformation, Cancers (Basel) 7 (4) (2015) 2466–2485.
- [52] J. Zhang, et al., Circular RNA hsa\_circ\_0023404 exerts an oncogenic role in cervical cancer through regulating miR-136/TFCP2/YAP pathway, Biochem. Biophys. Res. Commun. 501 (2) (2018) 428–433.
- [53] X. Yu, M. Odenthal, J.W. Fries, Exosomes as miRNA carriers: formation-functionfuture, Int. J. Mol. Sci. (2016) 17(12).
- [54] H. Bai, et al., Exo-circRNAs: a new paradigm for anticancer therapy, Mol. Cancer 18 (1) (2019) 56.
- [55] Y. Koga, et al., Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces, J. Gastrointest. Oncol. 2 (4) (2011) 215–222.