



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

# **Caracterización de parásitos de *Trypanosoma cruzi* en fase estacionaria ¿Un nuevo estadio pre-adaptativo?**

Fabricio Hernández

Tutora: Dra. Leticia Pérez Díaz

Co-tutor: Dr. Martín Ciganda

Tesis de Grado

Laboratorio de Interacciones Moleculares

Montevideo, Uruguay

2018



# ÍNDICE

---

<b>1</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
3.1	Epidemiología .....	7
3.2	Características clínicas de la enfermedad .....	9
3.3	Tratamiento.....	10
3.4	Características generales de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	11
3.5	Ciclo de vida del parásito .....	11
3.6	Características celulares del parásito .....	13
3.7	Organización genómica y biología molecular .....	15
3.8	Interacción <i>T. cruzi</i> y sistema complemento.....	17
<b>4</b>	<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	Hipótesis:.....	19
4.2	Objetivo general: .....	19
4.3	Objetivos específicos:.....	19
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
5.1	Composición de medios de cultivo y soluciones utilizadas: .....	21
5.2	Cultivo <i>in vitro</i> de parásitos.....	21
5.3	Conteo de parásitos para curva de crecimiento .....	21
5.4	Conteo de tripomastigotas metacíclicos.....	22
5.5	Análisis morfológicos.....	22
5.6	Análisis de viabilidad de los parásitos .....	24
5.7	Extracción de ARN .....	25
5.8	Ensayo de sensibilidad al sistema complemento de suero humano .....	26
5.9	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	26

<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
6.1	Realización de curvas de crecimiento a partir de epimastigotas de la cepa CL Brener para determinar puntos de interés para su estudio.....	28
6.2	Análisis de la tasa de crecimiento de epimastigotas en diferentes fases de la curva de crecimiento.....	30
6.3	Estudiar cambios morfológicos del parásito durante la transición a fase estacionaria mediante microscopía. ....	32
6.4	Evaluación del contenido de ARN total por parásito .....	34
6.5	Cambios en el perfil de proteínas totales .....	36
6.6	Análisis de cambios en la resistencia de los parásitos a las proteínas del complemento humano durante la transición a fase estacionaria .....	38
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>42</b>
7.1	Conclusiones.....	42
7.2	Perspectivas.....	43
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>

## 1 ABREVIATURAS

---

°C	Grado Celsius
uL	Microlitros
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
ug	Microgramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CA	Calceína
IP	Ioduro de Propidio
PBS	Tampón salino de fosfato
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
g	Aceleración de la gravedad terrestre
SFB	Suero fetal bovino
BHI	Brain-Heart Infusion
PFA	Paraformaldheído

## 2 RESUMEN

---

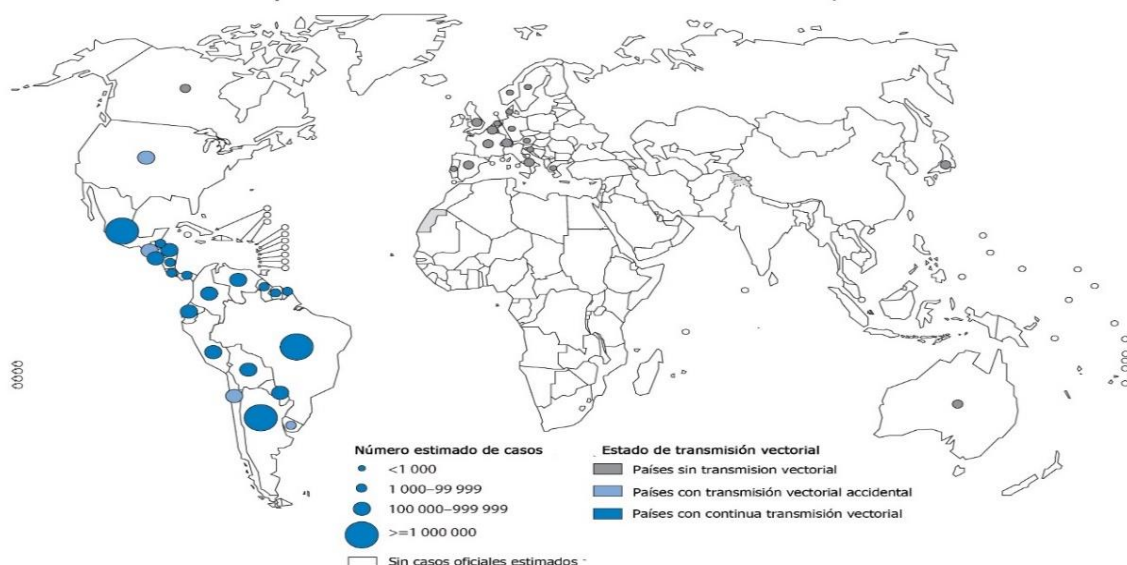
*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, considerada por la OMS como una enfermedad desatendida y un importante problema socio-económico en Latinoamérica. El parásito presenta diferentes estadios a lo largo de su ciclo de vida. En el intestino del insecto vector se encuentran los parásitos en forma epimastigota no infectiva que se diferencian en el tracto rectal del insecto en tripomastigotas metacíclicos, estadio no replicativo responsable de la infección en mamíferos. Poco se sabe de la transición entre ambos estadios. Experimentalmente se ha demostrado que el estrés nutricional desencadena el pasaje de epimastigotas a metacíclicos. Se ha propuesto que parásitos estresados en fase estacionaria constituirían un estadio diferente pudiendo diferenciarse a metacíclicos o volver al estadio epimastigota replicativo según las condiciones de estrés nutricional. Con el fin de caracterizar estos parásitos en fase estacionaria se realizaron curvas de crecimiento y se determinaron puntos claves para evaluar morfológicamente los parásitos mediante microscopía. Se evaluaron las tasas de crecimiento de los parásitos en los puntos de interés seleccionados. Se estudió el contenido de ARN por parásito. Sumado a lo anterior se analizó el perfil de proteínas totales. Se evaluó la resistencia al complemento de los parásitos mediante incubación con suero humano sin descomplementar y descomplementado por calor, para evaluar si estos parásitos en fase estacionaria son sensibles como los epimastigotas o resistentes como los tripomastigotas metacíclicos. En todos los casos se analizó la viabilidad de los parásitos mediante incubación con calceína e yoduro de propidio y posterior análisis por citometría de flujo. Estos resultados contribuyen a la caracterización de *T. cruzi* en fase estacionaria, un punto clave del ciclo de vida donde se determina su diferenciación hacia el estadio infectivo en la ampolla rectal del insecto.

## 3 INTRODUCCIÓN

### 3.1 EPIDEMIOLOGÍA

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, descubierta en 1909 por el doctor brasileiro Carlos Chagas [1] y considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad desatendida y un importante problema socioeconómico para la región. Se estima que entre 7 y 8 millones de personas en el mundo están afectadas por esta enfermedad potencialmente letal, concentrándose la mayor parte de estas personas en las regiones rurales más pobres de Latinoamérica, donde la enfermedad es endémica en 21 países [2]. Aproximadamente 100 millones de personas en las Américas viven en zonas de riesgo, por lo que anualmente se reportan alrededor de 56000 nuevos casos y se informan cerca de 12000 muertes al año por complicaciones en la fase aguda y crónica [3]. En los últimos años, la enfermedad ha empezado a expandirse a zonas urbanas, fuera de las zonas rurales y marginales dentro del área endémica a la que estaba tradicionalmente limitada. Por otro lado, se han reportado nuevos casos en zonas no endémicas como Estados Unidos, Canadá, algunos países de Europa y en el oeste del Pacífico, debido a los altos flujos migratorios de poblaciones entre América Latina y el resto del mundo (Figura 1)[2]. Por tanto, la enfermedad de Chagas se ha convertido en un problema de salud pública incluso en países donde no hay transmisión vectorial del parásito, en donde la transmisión ocurre principalmente mediante transfusiones sanguíneas y trasplantes de órganos.

Distribución de casos infectados por *Trypanosoma cruzi*, basados en estimaciones oficiales y el estado de la transmisión vectorial, 2006-2009



**Figura 1.** Distribución mundial de casos reportados de infección con *Trypanosoma cruzi*, basados en estimados oficiales y el estatus de la transmisión vectorial. En azul se muestran los países endémicos de Latinoamérica y en gris los países donde la enfermedad se disemina debido a las altas tasas migratorias hacia zona no endémicas. Adaptado de (WHO, 2017).

La enfermedad de Chagas puede transmitirse a seres humanos y a más de 150 especies de animales domésticos y mamíferos. Existen diversos mecanismos de transmisión de la enfermedad: transmisión vectorial que constituye el mayor porcentaje de nuevos casos (y donde se incluye la contaminación a través de la ingesta en forma accidental de alimentos contaminados con *T. cruzi*), transmisión mediante transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos, transmisión congénita, y en menor medida, transmisión mediante accidentes de laboratorio. La transmisión vectorial es mediada por insectos hematófagos de la familia Triatominae, también conocidos por el nombre vulgar "vinchucas", que actúan como hospederos intermediarios de *T. cruzi* adquiriendo el parásito de la sangre de un mamífero infectado, multiplicándolo luego en su tubo digestivo para finalmente eliminarlo en su materia fecal en su forma infectiva. Sólo algunas de las 148 especies de triatominos hasta ahora descritas tienen importancia epidemiológica, particularmente *Triatoma infestans* (Cono Sur), *Rhodnius prolixus* (Centroamérica) y *Triatoma dimidiata* (México hasta Panamá con brotes en Colombia, Venezuela y Ecuador) son los vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre (Figura 2)[4].



*Triatoma infestans*



*Rhodnius prolixus*



*Triatoma dimidiata*

**Figura 2.** Principales especies de insectos vectores responsables de la transmisión de *T. cruzi* al ser humano.

Debido a que no hay una vacuna efectiva contra la enfermedad de Chagas y un gran número de animales silvestres sirven como reservorio para *T. cruzi*, la erradicación de la enfermedad resulta muy difícil. Los principales métodos de control están enfocados en el control vectorial y el acceso temprano a la asistencia sanitaria de la población infectada.

El control de vectores incluye: control químico por insecticidas en domicilios infectados, mejoras de las casas y sus alrededores para prevenir la infestación, medidas preventivas personales como el uso del mosquitero y la educación de la población. También existen otros métodos de control, como



la realización de tamizaje serológico de sangre de donantes para prevenir la infección por transfusiones de sangre o plasma y trasplantes de órganos. Además, este control se realiza también en los recién nacidos y otros hijos de madres infectadas, para diagnosticar y tratar tempranamente el problema. Por otra parte, para prevenir la transmisión oral se intenta implementar buenas prácticas de manufactura enfatizando la higiene en la preparación de alimentos, en el transporte, el almacenamiento y el consumo de los mismos[2]. En laboratorios, la utilización de protocolos de seguridad estándar como el uso de túnicas, guantes, mascarillas, lentes y cámaras de bioseguridad contribuyen a minimizar el riesgo de accidentes, sobre todo cuando se trabaja con la forma infectiva del parásito.

### 3.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad de Chagas consta de dos fases clínicas claramente diferenciadas. Una fase inicial o aguda, que es seguida por una fase crónica que puede ser categorizada en indeterminada, cardíaca, o digestiva, presentando cada una diferentes manifestaciones clínicas [5]. La fase aguda puede durar uno o dos meses luego de contraída la infección o puede pasar inadvertida. Durante esta fase se encuentra una gran cantidad de parásitos circulantes en el torrente sanguíneo, siendo además todas las células nucleadas del hospedero blancos potenciales de infección. La sintomatología durante esta etapa aguda puede ser de durabilidad e intensidad variables pero las manifestaciones clínicas más comunes son: fiebre, mialgias, múltiples linfadenopatías, dolores de cabeza, dolor abdominal y torácico, diarrea, miocarditis, y más raramente meningoencefalitis. Muchos de estos síntomas no son específicos de la enfermedad, por lo que algunos pacientes infectados no son diagnosticados rápidamente y no reciben la atención médica adecuada. Otros signos primarios que pueden aparecer dependiendo del sitio de inoculación son: un nódulo inflamatorio (chagoma) o edema palpebral unilateral (signo de Romana). La muerte ocurre ocasionalmente en esta fase en un porcentaje menor al 5% y es el resultado de la miocarditis, derrame pericárdico, y meningoencefalitis [6]. El final de la fase aguda se produce por el desarrollo de la respuesta inmune, la parasitemia se reduce a bajas concentraciones y el número de parásitos en los tejidos disminuye. Sin embargo, el parásito no se elimina completamente por lo que la infección en algunos tejidos persiste indefinidamente en la vida del huésped [7]. Luego de la fase aguda los pacientes pueden entrar en la fase indeterminada de la enfermedad de Chagas. En la mayoría de los casos (70% a 80%), los pacientes son asintomáticos toda su vida o pueden presentar síntomas leves y no específicos. Los pacientes en esta etapa

asintomática de la enfermedad presentan una excelente prognosis y su expectativa de vida es similar a la de un paciente sin Chagas [5]. El 20-30 % de los infectados progresan de una forma indeterminada con ausencia de signos y síntomas a una fase crónica generalmente 10 a 30 años después de la infección inicial. Durante la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo[6]. Alrededor del 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos, los más comunes son: miocardiopatía, aneurisma, alteraciones del ritmo y conducción del corazón. Cerca de un 10% de los pacientes presentan alteraciones digestivas (agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita por arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca progresiva por destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones[2].

### 3.3 TRATAMIENTO

Desde hace 5 décadas, el tratamiento de la enfermedad de Chagas se basa principalmente en dos drogas antiparasitarias nitroaromáticas de amplio espectro llamadas Nifurtimox y Benznidazol. Estas dos drogas son más efectivas en los comienzos de la fase aguda con una tasa de curación del 80%. El tratamiento es recomendado para todos los casos de infección aguda, congénita, y también para los niños hasta los 18 años con enfermedad crónica[6]. El tratamiento con estos medicamentos también está indicado en caso de reactivación de la infección y en los pacientes al principio de la fase crónica sobre la cual el efecto del tratamiento aún permanece en debate. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos disminuye a medida que transcurre el tiempo desde el inicio de la infección dada la resistencia desarrollada por parte de los parásitos. Además, presentan severos efectos secundarios asociados con su alta toxicidad estando contraindicados en embarazadas y personas con insuficiencia renal o hepática. El Nifurtimox tampoco puede administrarse en personas con antecedentes de enfermedades del sistema nervioso o trastornos psiquiátricos. De todas formas los posibles beneficios de la medicación usada para combatir el avance de la enfermedad de Chagas deben sopesarse contra las posibles reacciones adversas antes mencionadas y la duración prolongada del tratamiento [2].

### 3.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

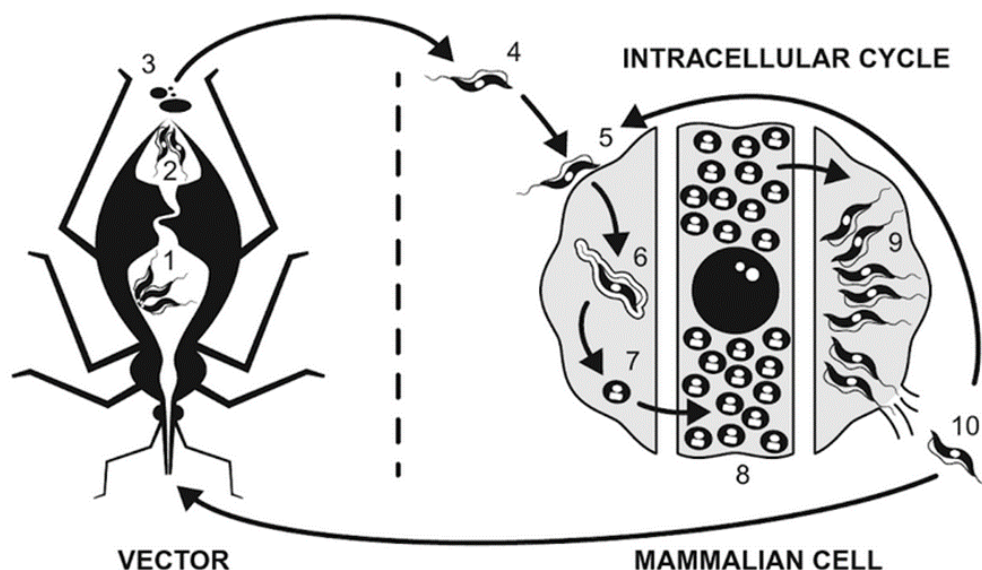
La clasificación taxonómica del parásito *Trypanosoma cruzi* es la siguiente: Dominio Eukarya, Reino Protista, Subreino Excavata, Filo Sarcomastigophora Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplasidiae, Familia Trypanosomatidae, Genero Trypanosoma, Subgénero Schizotrypanuma. Es un organismo unicelular que tiene un ciclo de vida complejo que transcurre en dos tipos de hospederos: un vector invertebrado y un hospedero vertebrado. El ciclo de vida del parásito comprende varias etapas de desarrollo. Entre estos estadios se encuentran formas de vida replicativas y no replicativas, así como formas infectivas y no infectivas [8]. Se distinguen al menos cuatro estadios bien diferenciados: amastigotas y tripomastigotas sanguíneos, que se encuentran en el hospedero mamífero, y epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos, que se desarrollan en el insecto vector. A lo largo de su vida, el parásito exhibe cambios profundos en su metabolismo y en su morfología (forma celular, tamaño celular, posición de núcleo y kinetoplasto, longitud del flagelo) durante la transición de un estadio a otro [9].

### 3.5 CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

El ciclo de vida del parásito comienza cuando un insecto triatomineo hematófago infectado se alimenta de sangre de un hospedero mamífero no infectado y libera tripomastigotas metacíclicos en sus heces cerca del sitio de inoculación. Los parásitos ingresan al hospedero cuando la persona se frota la herida haciendo que las heces entren en contacto con la lesión o las mucosas intactas. Una vez adentro del mamífero, los tripomastigotas metacíclicos son ingeridos por macrófagos, pudiendo penetrar otras células nucleadas como fibroblastos y células epiteliales. Una vez fagocitados por los macrófagos, se forma la vacuola parasitófora alrededor del parásito y los tripomastigotas metacíclicos en su interior se diferencian hacia amastigotas intracelulares. Los amastigotas intracelulares son capaces de lisar la vacuola y liberarse al ambiente citoplasmático. En el citoplasma los amastigotas se multiplican por fisiones binarias sucesivas. Luego de varias rondas de división, los amastigotas inician su diferenciación hacia tripomastigotas sanguíneos que rompen la célula hospedera por el exceso de parásitos, para ser finalmente liberados al torrente sanguíneo. Los tripomastigotas sanguíneos pueden invadir otras células de una variedad de tejidos dada su alta capacidad infectiva y transformarse nuevamente en amastigotas intracelulares en nuevos sitios de infección o ser ingeridos por un insecto (Figura 3). Los tripomastigotas no son replicativos, por lo que la replicación se retoma cuando los parásitos penetran en otras células o cuando son ingeridos por un nuevo vector que se alimenta de sangre que contiene parásitos circulantes. Una vez dentro del insecto vector, los

tripomastigotas son dirigidos al intestino del insecto donde se diferencian a epimastigotas replicativos. En el intestino medio los epimastigotas empiezan a multiplicarse por fisión binaria y a adherirse a la membrana del intestino. Finalmente, hacia el intestino posterior los epimastigotas adheridos a la pared del intestino se diferencian en tripomastigotas metacíclicos infecciosos. Posteriormente, éstos pueden ser liberados a través de las heces del insecto, comenzando nuevamente el ciclo de vida en un nuevo hospedero vertebrado [9] [10].

Si bien se sabe que el estrés nutricional dispara mecanismos que inducen la diferenciación de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos, poco se sabe de los procesos moleculares que dirigen este pasaje de un estado a otro bien diferente. Algunos autores sostienen que los epimastigotas creciendo en cultivo axénico en fase estacionaria y fase estacionaria tardía constituyen un estadio intermedio de transición entre epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos. Estos parásitos pueden o bien diferenciarse en tripomastigotas metacíclicos no replicativos e infectivos si continúa el estrés nutricional, o volver a la forma epimastigota replicativa en caso de que vuelva a existir disponibilidad de nutrientes[11].



**Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** Un insecto triatómino ingiere sangre con tripomastigotas sanguíneos circulantes de un hospedero infectado. Los parásitos se diferencian a epimastigotas y se multiplican en el intestino medio del insecto (1). Los epimastigotas migran hacia el intestino posterior y se diferencian en tripomastigotas metacíclicos infecciosos (2). Cuando el insecto se alimenta de sangre de un mamífero, los tripomastigotas metacíclicos son liberados en las heces cerca del sitio de la herida (3). Estos tripomastigotas metacíclicos entran en el hospedero mamífero a través de la herida o a través de las membranas mucosas intactas (4). Una vez dentro del hospedero, los tripomastigotas invaden las células cerca del sitio de la inoculación (5) y se diferencian en amastigotas intracelulares (6) (7). Los amastigotas se multiplican por fisión binaria (8) hasta que se diferencian en tripomastigotas sanguíneos (9) que luego de romper la célula se liberan al torrente sanguíneo (10). Los tripomastigotas sanguíneos infectan células de una variedad de tejidos y se transforman nuevamente en amastigotas intracelulares (5) donde la replicación se reanuda. También los tripomastigotas sanguíneos pueden ser ingeridos por otro vector diferente comenzando nuevamente el ciclo con la diferenciación en epimastigotas y multiplicación en el intestino medio (1). Extraído de (Elsevier, 2017)

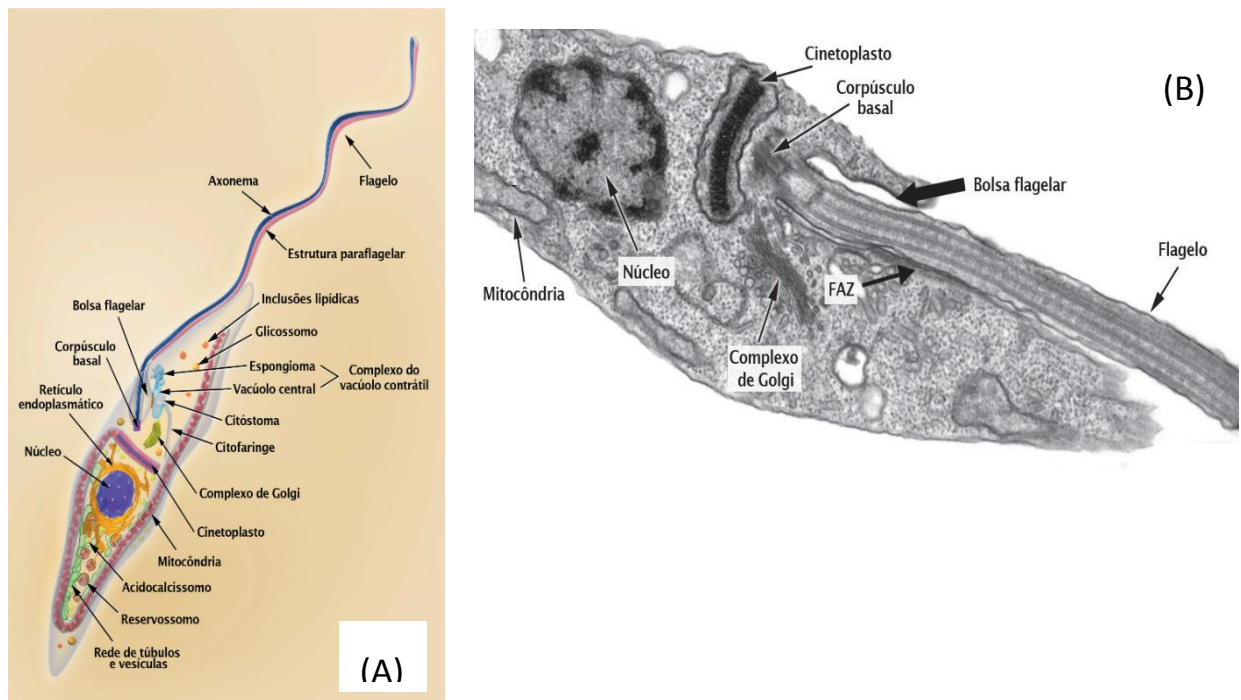
### 3.6 CARACTERÍSTICAS CELULARES DEL PARÁSITO

*T. cruzi* contiene un núcleo con una organización estructural semejante al de otras células eucariotas, que mide 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y que contiene un nucléolo centralizado [9]. La forma del núcleo es redondeada en amastigotas y epimastigotas, mientras que en tripomastigotas metacíclicos aparece como un organelo alargado con alto contenido de heterocromatina y sin nucléolo[11]. La cromatina no se condensa durante el ciclo celular por lo que los cromosomas son difíciles de distinguir y el nucléolo se dispersa mientras transcurre la división pero reaparece sobre el final de la división celular [12].

A lo largo del cuerpo celular del parásito, se extiende una única mitocondria. El ADN mitocondrial contenido en ella puede representar hasta el 30 % del ADN total del parásito y se organiza en forma de maxi y mini círculos concatenados entre sí que dan origen a una estructura denominada kinetoplasto localizada cercana al cuerpo basal. La forma y posición del kinetoplasto con respecto al núcleo varía dependiendo del estadio en el cual se encuentre el parásito y siempre se encuentra próximo al cuerpo basal.

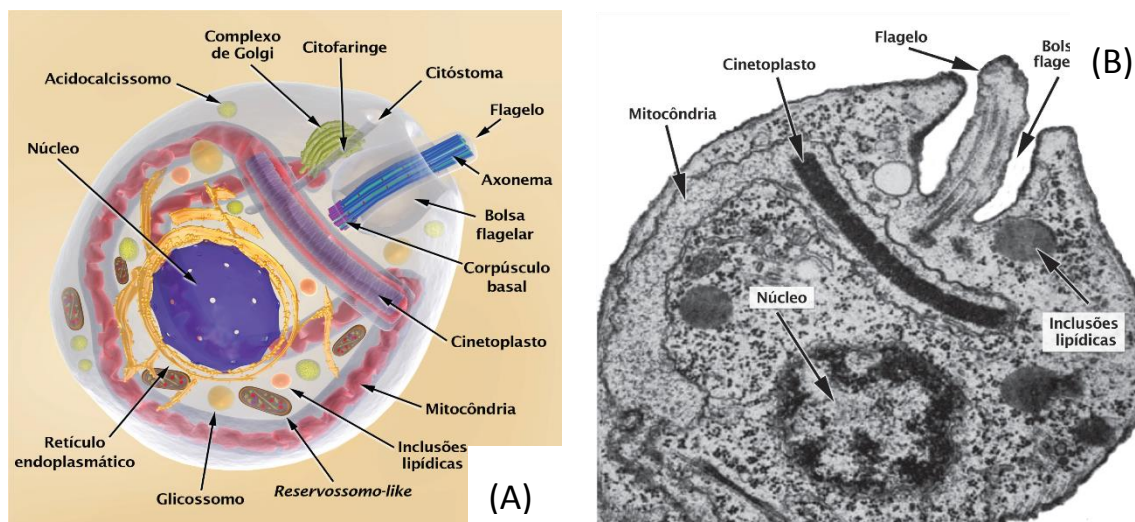
El flagelo emerge de una invaginación llamada bolsa flagelar y su longitud varía según la etapa de desarrollo en la que se encuentre el parásito. El flagelo participa en dos actividades muy importantes del parásito que son la movilidad y la adhesión a la superficie de las células del hospedero vertebrado en el caso de los tripomastigotas y a las membranas de las microvellosidades que recubren el intestino del invertebrado en el caso de los epimastigotas [13].

Los **epimastigotas** son la forma replicativa no infectiva que se encuentra en el intestino del insecto. Son fusiformes y en la zona anterior al núcleo tienen un kinetoplasto con forma de disco y una bolsa flagelar de donde emerge el flagelo que se extiende a lo largo de todo el cuerpo del parásito. Tienen un largo entre 10 a 20  $\mu\text{m}$  pero van creciendo a medida que van diferenciándose en tripomastigotas metacíclicos a lo largo del intestino del insecto (Figura 4).



**Figura 4. (A)** Vista esquemática de la forma epimastigota de *T. cruzi* donde se señalan las principales estructuras celulares. **(B)** Microscopía electrónica de la forma epimastigota realizada en un microscopio electrónico de transmisión. Extraído de [9].

Los amastigotas son la forma replicativa que se encuentra dentro de las células del hospedero. Presenta una forma redondeada u oval que puede alcanzar un tamaño entre 1,5 y 5  $\mu\text{m}$ . Tiene un flagelo muy reducido, núcleo relativamente grande redondo, y presenta un kinetoplasto con forma de bastón que se encuentra entre el núcleo y el flagelo (Figura 5).

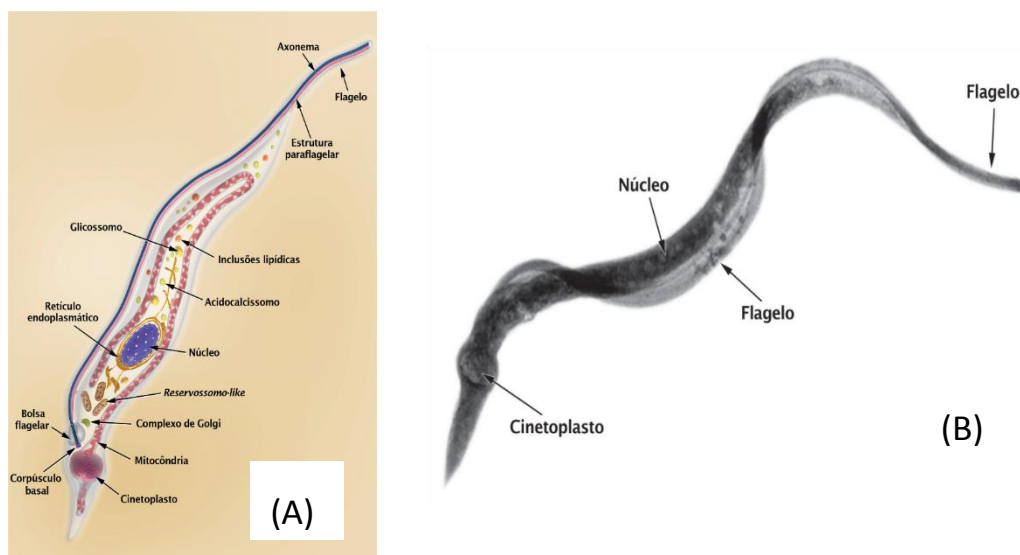


**Figura 5. (A)** Vista esquemática de la forma amastigota de *T. cruzi* donde se señalan las principales estructuras celulares. **(B)** Microscopia electrónica de la forma amastigota realizada en un microscopio electrónico de transmisión. Extraído de [9].



Los **tripomastigotas metacíclicos** miden alrededor de 20  $\mu\text{m}$  de largo y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y constituyen un estadio infeccioso no replicativo. Tienen forma alargada y presentan un núcleo cercano a la parte posterior de su cuerpo. El kinetoplasto, a diferencia de los epimastigotas, se encuentra ubicado posterior al núcleo.

Los **tripomastigotas sanguíneos** son la forma no replicativa infecciosa que se encuentra en la sangre del hospedero mamífero infectado. Morfológicamente son parecidos a los metacíclicos pero son menores en tamaño y dado que están expuestos a las moléculas del sistema inmune del hospedero, expresan en su superficie diferentes proteínas. Las más caracterizadas en tripomastigotas sanguíneos son las mucinas y transalidasas que participan en la protección y evasión contra el sistema inmune[9] (Figura 6).



**Figura 6. (A)** Vista esquemática de la forma tripomastigota de *T. cruzi* donde se señalan las principales estructuras celulares. **(B)** Microscopía de la forma tripomastigota realizada en un microscopio electrónico de alto voltaje. Extraído de [9].

### 3.7 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Con el genoma de *T. cruzi* prácticamente secuenciado en su totalidad en el 2005 por el grupo de El-Sayed y cols., se tuvo de manera accesible una gran cantidad de información sobre la biología de este parásito [14]. Este estudio reveló que el genoma haploide de *T. cruzi* contiene 60,3 Mb distribuidas en aproximadamente 41 cromosomas y los homólogos pueden tener diferente tamaño [15]. Más del 50% del genoma consiste en secuencias repetidas como ser retrotransposones y familias de proteínas de superficie, que incluyen transalidasas, mucinas y MASP. Cada una de estas familias incluye varios cientos de genes los cuales pueden ser expresados simultáneamente [16].

Una particularidad de los tripanosomátidos es que no presentan regulación a nivel transcripcional, debido a su inusual organización del genoma. Los genes que codifican para proteínas se disponen en *tándem* y se transcriben como largos policistrones de 10–100 genes, los cuales, a diferencia de los operones bacterianos, en su mayoría no están emparentados funcionalmente entre sí [17]. Por otro lado, no se han encontrado promotores canónicos para la ARN Polimerasa II lo que sugiere ausencia de control transcripcional para genes codificantes para proteínas [18]. Se postula que la transcripción de los largos policistrones comenzaría en las regiones de cambio de hebra divergente donde la estructura secundaria del ADN y modificaciones en la cromatina jugarían un rol muy importante finalizando en las regiones de cambio de hebra convergente [19][20]. Por tanto, todos los precursores de ARN policistrónicos se generarían constitutivamente con una tasa de transcripción similar y la regulación de la expresión de genes ocurriría básicamente a nivel post-transcripcional [18][21][22].

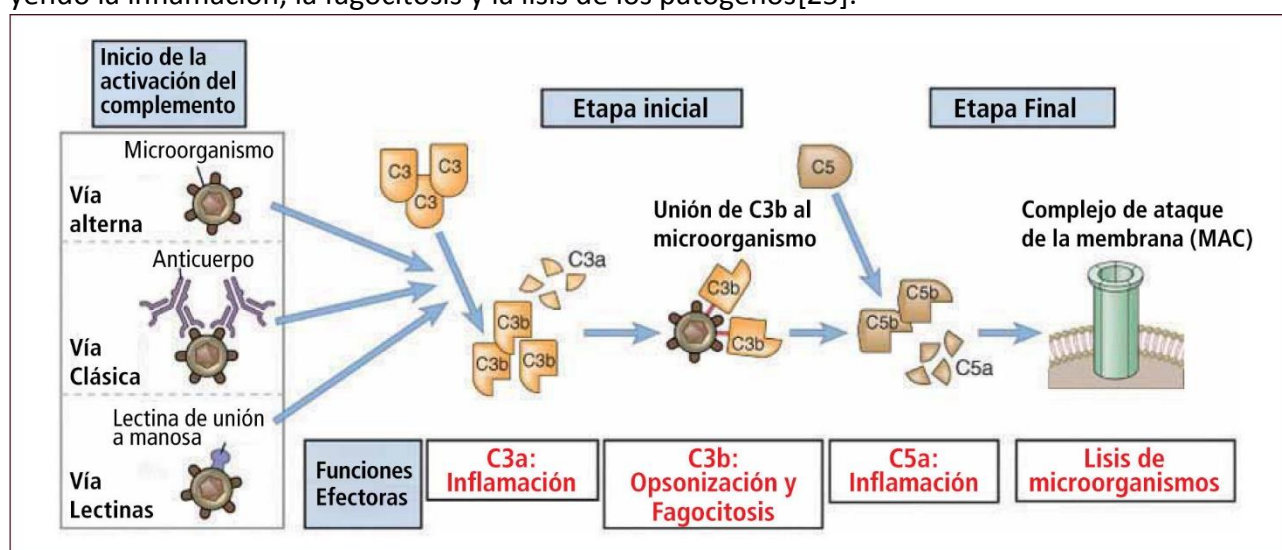
Estos ARNs policistrónicos son procesados por mecanismos de *trans*-splicing y poliadenilación que dan lugar a los ARNs mensajeros individuales. El *trans*-splicing es un proceso por el cual se da la maduración de los ARN mensajeros transcritos primarios al agregarse una secuencia de ARN (*spliced leader*) de 39 nucleótidos al extremo 5' en una posición ubicada unos nucleótidos antes del sitio de inicio de un marco abierto de lectura. Se sugiere que la adición de la secuencia *splice leader* provee la estructura CAP 5' a los ARNm [23]. El proceso de poliadenilación es similar al resto de los eucariotas superiores, aunque aún no se ha podido describir una secuencia consenso que actúe como señal específica de poliadenilación. Tanto la poliadenilación como la adición de la secuencia *spliced leader* ocurre co-transcripcionalmente y es fundamental para la traducción de los mensajeros.

Otra característica distintiva de los tripanosomátidos es que la gran mayoría de los genes que codifican para proteínas carecen de intrones, con excepción de los genes que codifican para la polIA polimerasa, el gen del ARNt-Tyr y un par de proteínas hipotéticas [24].



### 3.8 INTERACCIÓN *T. CRUZI* Y SISTEMA COMPLEMENTO

La interacción entre las formas infectivas de *T. cruzi* y los factores del sistema inmune del hospedero es un punto clave a tener en cuenta para un mejor entendimiento de las estrategias a las que recurre el parásito para evadir el mismo. En este contexto, el sistema complemento juega un rol importante en el reconocimiento y en el control de la invasión parasitaria ya que es un componente clave de la inmunidad innata con un rol fundamental en la primera línea de defensa contra agentes invasores. Este sistema está constituido por más de 35 proteínas plasmáticas y de membrana celular ampliamente distribuidas en los tejidos que se puede activar mediante tres vías diferentes: vía de las lectinas, vía clásica y vía alternativa. La activación deriva en importantes respuestas biológicas incluyendo la inflamación, la fagocitosis y la lisis de los patógenos[25].



**Figura 7.** Representación esquemática de las vías de activación del complemento y sus principales funciones efectoras. Se observan las tres vías de activación del complemento: la vía clásica, que se inicia gracias a los anticuerpos adheridos a la superficie del patógeno; la vía alternativa, que se inicia por la simple presencia del antígeno, y la vía de las lectinas que se activa por moléculas de la superficie del patógeno. Todas ellas convergen en la formación de la convertasa de C3 y continúan hacia la vía final común que es la formación del MAC (complejo de ataque de la membrana). Además se pueden ver las funciones efectoras de otros factores intermedios. Adaptado de (Elsevier, 2017)

Es importante considerar que la interacción depende del estadio en el cual se encuentra el parásito. Estudios experimentales demostraron que el complemento puede ser activado por las formas amastigotas, epimastigotas y tripomastigotas pero solo la forma epimastigota no infectiva replicativa es susceptible a los efectos del complemento[10]. Sin embargo, algunas cepas de tripomastigotas metacíclicos han demostrado ser susceptible a la muerte mediada por el complemento *in vitro* [26]. Se postula que durante la transición de parásitos no infectivos susceptibles al complemento a la forma infectiva resistente al mismo, los parásitos van adoptando estrategias para escapar de los efectos tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa para que la infección tenga éxito. Una de ellas es la expresión de diferentes proteínas de superficie que participan en la inhibición,

activación y evasión del complemento[10]. Entre las más destacadas se encuentran la proteína Calcirreticulina (CRT), una chaperona que une calcio y además regula la transcripción entre otras funciones. En tripomastigotas, esta proteína es translocada del retículo endoplasmático al exterior de la célula inhibiendo las rutas clásicas y de las lectinas del sistema complemento por medio de su unión al dominio de reconocimiento de carbohidratos de la MBL (lectina de unión a manosa) impidiendo la interacción con sus ligandos naturales[27]. La proteína T-DAF (*Tripomastigote Decay-Accelerating Factor*) es una glicoproteína presente en tripomastigotas metacíclicos y tripomastigotas sanguíneos que imita la actividad de una proteína reguladora del complemento llamada DAF. La proteína T-DAF acelera la disociación de la convertasa de C3 (factor fundamental en la activación del complemento) interfiriendo sobre la activación de las vías del complemento[28]. Otra glicoproteína que participa en la evasión del complemento es la TcCRP (*Trypanosoma cruzi Complement Regulatory Protein*) o también llamada gp160 que se encuentra en la superficie de los tripomastigotas, así como también en forma soluble. TcCRP actúa uniéndose a C3b y C4b, dos proteínas esenciales en la formación de la convertasa de C3, impidiendo la formación de esta y consecuentemente inhibiendo la activación de las vías del complemento[29]. Por otro lado, la proteína reguladora gp58/68 tiene un papel importante en la interacción con las células mamíferas y le confiere al parásito la capacidad para evadir la activación de la vía alternativa impidiendo la unión de C3B con el factor B fundamental para la formación de la convertasa de C3 [10]. Se ha demostrado también que los tripomastigotas metacíclicos inducen la formación de microvesículas formadas con las membranas de la célula del hospedero que interactúan con la convertasa de C3 logrando así una inhibición de la activación y un aumento de la supervivencia del parásito[30].

Comprender las estrategias de evasión del complemento es crucial para el desarrollo de aproximaciones innovadoras en la batalla contra la infección por *T. cruzi* y puede allanar el camino para las inmunoterapias. Asimismo, la identificación de los procesos que se van modulando en la transición desde las formas epimastigotas no infectivas hacia las formas tripomastigota metacíclica infectiva permitiría contribuir a la identificación de nuevas proteínas candidatas a participar en mecanismos de evasión del sistema inmune hospedero.

En este trabajo se plantea la caracterización de *T. cruzi* durante la transición de parásitos epimastigotas creciendo en fase exponencial hasta la fase estacionaria tardía. Nos planteamos estudiar los cambios morfológicos, metabólicos y de expresión como forma de adaptación del parásito en su preparación para la metaciclogénesis.

## 4 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

### 4.1 HIPÓTESIS:

La fase de crecimiento estacionaria en *T. cruzi* en cultivo *in vitro* constituye una etapa importante de transición epimastigotas-tripomastigotas metacíclicos. Se postula que en dicha fase ocurriría una disminución en la tasa de replicación de los parásitos debido al estrés nutricional. Por otro lado, los parásitos en fase estacionaria de crecimiento cobrarían relevancia adicional pues durante esta etapa comenzarían a manifestarse muchos de los primeros cambios pre-adaptativos que sufre la forma epimastigota para transformarse en tripomastigota metacíclico. Por lo tanto, sería razonable postular la existencia de un nuevo estadio pre-adaptativo conformado por epimastigotas en fase estacionaria, durante el cual el parásito comienza a prepararse para la transición a formas metacíclicas infectivas y no replicativas.

### 4.2 OBJETIVO GENERAL:

Caracterización general de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* creciendo *in vitro* en las diferentes fases de la curva de crecimiento haciendo énfasis en su fase estacionaria y estableciendo una comparación con parásitos creciendo en fase exponencial y con tripomastigotas metacíclicos. En base a las características analizadas y a las diferencias encontradas entre las diferentes fases de crecimiento, se podrá determinar si efectivamente se trata de un nuevo estadio pre-adaptativo intermedio.

### 4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Realizar curvas de crecimiento a partir de epimastigotas la cepa CL Brener para determinar puntos de estudio de interés.
- 2) Estudiar cambios morfológicos del parásito durante la transición a fase estacionaria mediante microscopía.
- 3) Evaluar cambios en la tasa de crecimiento en parásitos en los puntos de interés seleccionados de la curva de crecimiento
- 4) Evaluar contenido de ARN total por parásito y cambios en el perfil de proteínas totales en los diferentes puntos de la curva determinados.

5) Analizar si existen cambios en la resistencia de los parásitos al complemento del suero humano durante la transición a fase estacionaria.

## 5 MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1 COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS:

Medio BHI (Brain-Heart Infusion-Tryptose): 33 g BHI, 3 g triptosa, 4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.4 g KCl, 0.3 g glucosa, 10 mL hemina, 990 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Adicionar 1% penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) y 10% de suero fetal bovino (SFB) tratado 30 minutos a 65°C para la inactivación del complemento.

Tampón TAE 50X 40mM Tris; 20 mM ácido acético; 1mM EDTA; pH 8,4

Tampón de corrida para SDS-PAGE 125 mM glicina, 25 mM Tris, pH=8,4; 0,1% SDS

Tampón de carga para SDS-PAGE: 25 mL Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4%; 20 mL glicerol; 2 mL  $\beta$ -mercaptoetanol o 3,1 g DTT; 1 mg azul de bromofenol.

PBS 1X: 0,145 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,0081 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,0015 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4

### 5.2 CULTIVO *IN VITRO* DE PARÁSITOS

Se utilizaron parásitos de la cepa CL Brener [31]. Los parásitos se crecieron a 28°C en medio de cultivo BHI suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado por calor a 65 °C durante 30 minutos y 1% de penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 100X. Para mantener los parásitos en buen estado metabólico previo a la realización de las curvas de crecimiento, se realizaron repiques cada tres días diluyendo los parásitos en fase exponencial de crecimiento hasta una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL al menos tres veces sucesivas. La curva de crecimiento se comenzó a partir del cuarto repique comenzando con una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL. Los ensayos se hicieron por triplicado.

### 5.3 CONTEO DE PARÁSITOS PARA CURVA DE CRECIMIENTO

La curva de crecimiento se realizó por conteo directo de parásitos de forma directa en cámara de Neubauer por triplicado en cada uno de los tres experimentos independientes. En algunos casos, se verificó la concentración de parásitos mediante pasaje de diferentes diluciones del cultivo en PBS 1x por Citómetro de flujo BD Accuri C6.

## 5.4 CONTEO DE TRIPOMASTIGOTAS METACÍCLICOS

Se analizó el porcentaje de tripomastigotas metacíclicos en las muestras de los diferentes puntos de la curva seleccionados. Para ello, se centrifugaron  $1 \times 10^7$  parásitos/mL a 3000 g durante 7 minutos. El *pellet* se lavó 2 veces con PBS 1X y luego se resuspendió en PFA 4% durante 30 minutos a 4°C y finalmente en 200 µL de PBS. Los parásitos se colocaron en un portaobjetos y se observaron en campo claro en el *ZOE Fluorescent Cell Imager* con el cual se tomaron fotos de varios campos por muestra. A partir de las fotos tomadas se utilizó el programa *ImageJ* [32] para contar el número de tripomastigotas metacíclicos por muestra en cada punto de la curva seleccionado. La distinción se hizo morfológicamente. Como control, se obtuvieron tripomastigotas metacíclicos a partir de parásitos del día 28 resuspendidos en PBS 1X durante 24 horas para obtener su morfología y compararlos al momento de contar en las muestras. Todas las muestras en los diferentes puntos se hicieron por triplicado.

## 5.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

Para analizar las características morfológicas de los parásitos en las diferentes fases de la curva de crecimiento se realizó observación directa de los mismos en *The ZOE Fluorescent Cell Imager* y por Microscopio Confocal Leica TCS-SP5.

En ambos casos se centrifugaron  $2 \times 10^7$  parásitos a 3000g durante 7 minutos. El *pellet* se lavó 2 veces con PBS 1X y luego se resuspendió en PFA 4% durante 30 minutos a 4°C. Finalmente se resuspendió en 200 µL de PBS. Finalmente se procedió a teñir como se indica a continuación:

### ***Tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)***

Se agregó 5 µL DAPI (10 mg/mL) y se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó nuevamente el preparado, se depositó en un portaobjetos, se agregó la solución de montaje (Prolong Diamond Antifade Thermo Fisher) y se selló con laca luego de colocado el cubreobjetos para finalizar los preparados. Los parásitos teñidos con DAPI fueron analizados por Microscopio Confocal Leica TCS-SP5.

### ***Tinción con Hematoxilina y Eosina***

Luego de fijados los parásitos con PFA se realizó un lavado con PBS 1X y se colocaron en un portaobjetos. Los parásitos se incubaron con hematoxilina durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron varios lavados con agua destilada y uno de 10 minutos con agua corriente. Se sumergió la muestra en Eosina durante 5 minutos y por último se realizaron lavados con etanol 95% y 100%. Finalmente se agregó medio de montaje y se sellaron los preparados con laca luego de colocar el cubreobjetos. Estos parásitos fueron analizados en *The ZOE Fluorescent Cell Imager*.

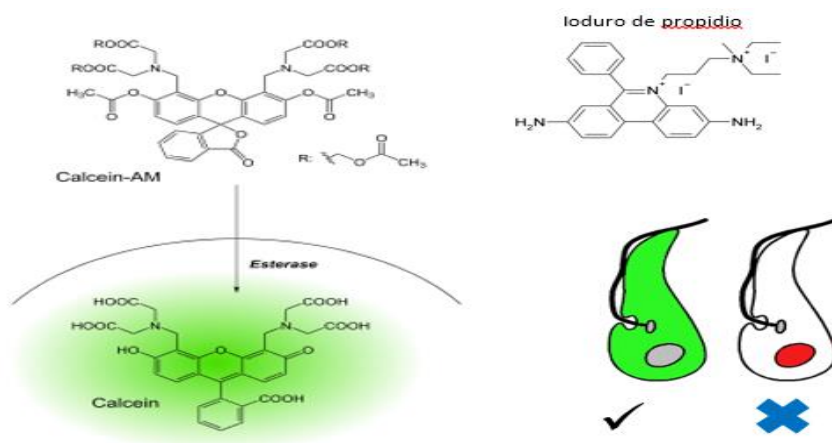
La morfología de parásitos en las diferentes etapas de la curva de crecimiento fue también evaluada mediante microscopía electrónica. Para ello, los parásitos fijados en PFA 4% se sometieron luego a deshidratación con una concentración creciente de acetona (30-100%) y fueron luego recubiertos de oro en el metalizador *Sputter Coater SCD050 / LEICA*. Después de la metalización, se observaron las muestras en un microscopio electrónico de barrido (*Philips XL30, Eindhoven, Países Bajos*) en la Universidad Pontífica Católica de Rio Grande do Sul (PUCRG).

## 5.6 ANÁLISIS DE VIABILIDAD DE LOS PARÁSITOS

Para analizar la viabilidad de los parásitos en las diferentes fases de la curva de crecimiento se usaron marcadores de vitalidad celular: Ioduro de Propidio (IP) y Calceína-AM (CA). Las células vivas presentan alta actividad esterasa intracelular, la cual es detectada por la conversión enzimática de la calceína-AM (*Calceina acetoxymethyl ester* de *Molecular Probes*) no fluorescente en calceína intensamente fluorescente por parte de las células vivas (Figura 8). La CA polianiónica es retenida dentro de las células vivas, produciendo una intensa fluorescencia verde uniforme en las células vivas (ex/em ~495 nm/~515 nm). El IP sólo entra en las células que tienen las membranas dañadas y se une a ácidos nucleicos, produciendo una fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas. En cambio, en células vivas, el IP se excluye por la membrana plasmática intacta.

Para estos ensayos, se centrifugó 1 mL de un cultivo durante 7 minutos a 3000g y se resuspendió a una densidad de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL. Los parásitos fueron lavados dos veces con PBS 1X y resuspendidos en 500  $\mu$ L de PBS 1X.

A 100  $\mu$ L de esta dilución se agregaron 2  $\mu$ L de CA  $5 \times 10^{-5}$  M y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se agregó 1  $\mu$ L de IP 100  $\mu$ g/mL y se dejó incubar 15 minutos más en las mismas condiciones. Los parásitos teñidos fueron analizados en un citómetro de flujo (*BD Accuri C6*, *BD Biosciences*), con un flujo de colección de 100  $\mu$ L/min, usando un filtro 533/30 (FL1) para CA y un filtro 670 nm *long pass* (FL3) para IP, y una longitud de onda de excitación de 488 nm. Los datos fueron analizados con el programa BD CSampler software (*BD Bioscience*).



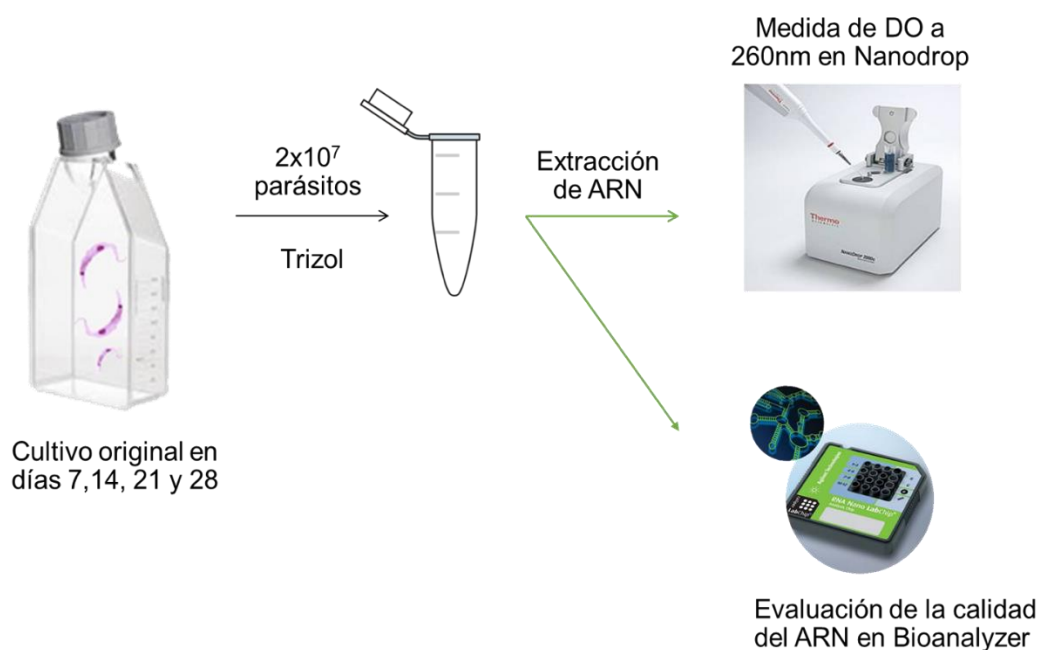
**Figura 8. Sondas fluorescentes usadas para análisis de viabilidad celular.** La detección de células vitales se basa en la conversión enzimática de la calceína-AM no fluorescente en calceína fluorescente por parte de las células vivas mediante enzimas con actividad esterasa. A la derecha se muestra la estructura de la molécula de ioduro de propidio que interacciona con el ADN doble cadena y actúa como marcador de células necróticas cuando el compuesto ingresa en la célula por daño en la membrana celular.



## 5.7 EXTRACCIÓN DE ARN

Para la extracción de ARN se siguió el protocolo TRIzol™ Reagent (Invitrogen) indicado por el fabricante. Brevemente, se tomaron 1 mL de parásitos de concentración  $2 \times 10^7$  parásitos/mL, se centrifugaron a 3000g durante 7 minutos y resuspendieron en 1 mL de Trizol. Se agregó cloroformo para extraer las proteínas y se separó la mezcla en dos fases, acuosa y orgánica. Como el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, se aisló la misma y se precipitó el ARN con isopropanol. Finalmente, el ARN se lavó con etanol 75% y se solubilizó en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La extracción de ARN se realizó por triplicado para cada uno de los puntos de la curva de crecimiento determinado.

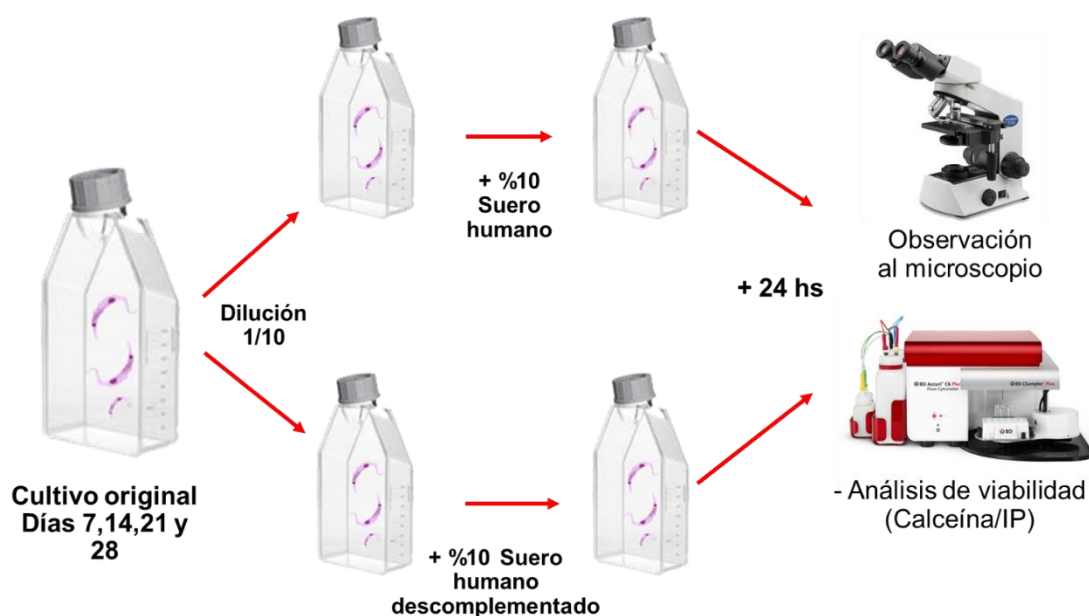
Se estimó para cada punto de la curva, la concentración de ARN por parásito mediante medidas de Absorbancia a 260 nm en NanoDrop™ Lite Spectrophotometer de *Thermo Scientific*. Además de evaluarse la cantidad de ARN extraída, se realizó además el análisis de la integridad del mismo mediante corrida en Bioanalyzer (Agilent RNA 6000 nano) (Figura 9).



**Figura 9.** Estrategia de trabajo empleada para la cuantificación y análisis del ARN. Se tomaron muestras del cultivo original en los diferentes puntos establecidos y se realizó la extracción de ARN con Trizol siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Posteriormente se analizaron la cantidad y calidad del ARN obtenido mediante medidas en espectrofotómetro de microvolúmenes y mediante corrida en Bioanalyzer.

## 5.8 ENSAYO DE SENSIBILIDAD AL SISTEMA COMPLEMENTO DE SUERO HUMANO

Para analizar si existen diferencias en la sensibilidad de los parásitos al sistema complemento se incubaron parásitos obtenidos a partir de diferentes fases de la curva de crecimiento y se diluyeron 1/10 en medio de cultivo en presencia de 10% de suero humano descomplementado por calor 15 minutos a 60°C y en paralelo en medio con 10% de suero humano sin descomplementar. En ambos casos se evaluó la viabilidad de los mismos a las 24 horas mediante marcado con sonda calceína y yoduro de propidio y posterior análisis por citometría en citómetro (BD Accuri C6, BD Biosciences) y por observación directa al microscopio (Figura 10).

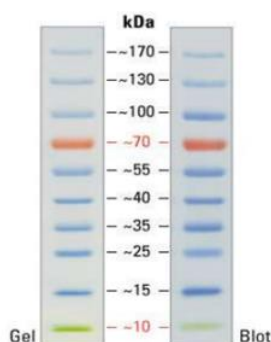


**Figura 10.** Estrategia de trabajo empleada para el análisis de resistencia de los parásitos al sistema complemento. Se tomaron muestras del cultivo original en los diferentes puntos establecidos y se realizó una dilución del mismo en presencia de suero humano descomplementado y en paralelo en presencia de suero humano sin descomplementar. Los cultivos se dejaron crecer por 24 horas a 28°C y luego fueron analizados por observación directa al microscopio y por marcado con CA-AM e IP con posterior análisis por citometría de flujo.

## 5.9 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida o SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*). El tratamiento con SDS convierte las proteínas en poli-aniones cargados negativamente, para luego ser separadas en un campo eléctrico de acuerdo con su peso molecular. Los geles de poliacrilamida empleados fueron discontinuos: se utilizó un gel concentrador y un gel separador. El gel concentrador se preparó con 5%: acrilamida:bisacrilamida 29:1; Tris-HCl pH 6,8 125 mM; SDS 0,1%; APS 0,1%; TEMED 0,05%, mientras que el gel separador 12%: poliacrilamida:bisacrilamida 29:1; Tris-HCl pH 8,8 390 mM; SDS 0,1%; APS 0,1%; TEMED 0,05%. Se

usó persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED) como agentes iniciador y catalizador. Las muestras se mezclaron con tampón de carga para SDS-PAGE 1X y se desnaturalizaron por calor a 100°C durante 5 minutos. Las corridas electroforéticas se realizaron a 150 V. Como marcador de peso molecular se empleó PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) (Figura 11). Los geles se visualizaron mediante tinción con  $\text{AgNO}_3$ . Este método permite detectar cantidades de proteínas que varían entre 5 a 10 ng y está basada en la unión de los iones de Ag a las cadenas laterales de los aminoácidos -en grupo carboxilo-, reduciéndose a plata metálica. El protocolo consistió en sumergir el gel en la solución de fijado (Etanol 50 %; Ácido acético 10 %) durante 20 minutos, luego incubar en etanol 80% por 10 minutos y posteriormente realizar un lavado con agua de 10 minutos. Seguidamente se realizó una reducción en una solución de tiosulfato por 1 minuto y se detuvo la reacción con lavados con agua. Se dejó 30 minutos a 4°C en  $\text{AgNO}_3$  2g/L y por último el revelado se realiza en solución 30 g/L NaOH y 0,5% formaldehído.



**Figura 11.** Marcador de peso molecular PageRuler Prestained Protein Ladder empleado en SDS-PAGE. Extraído de Thermo Scientific

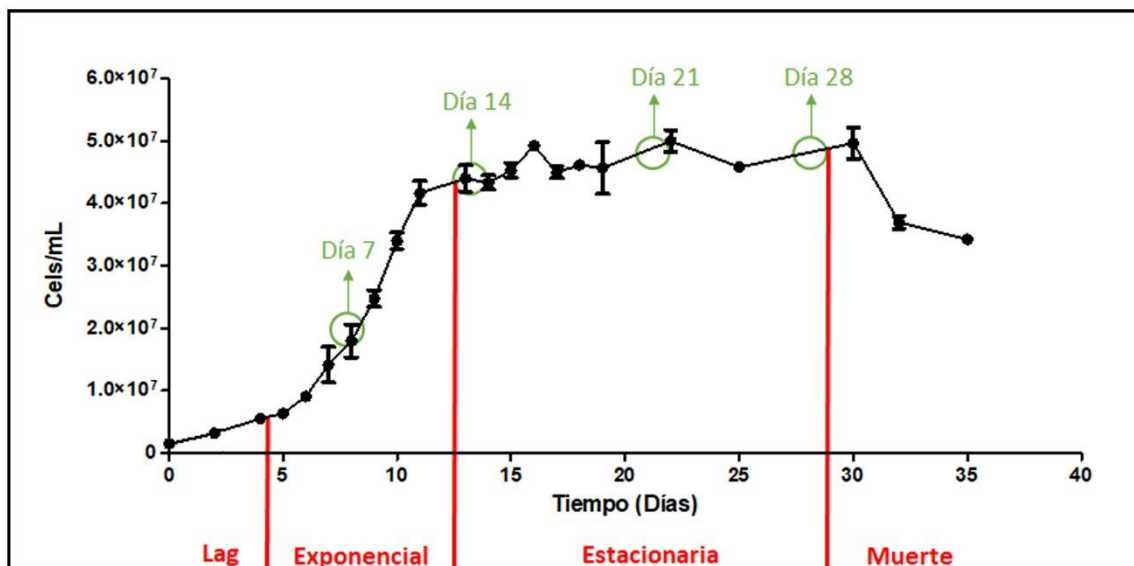
## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 6.1 REALIZACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO A PARTIR DE EPIMASTIGOTAS DE LA CEPA CL BRENER PARA DETERMINAR PUNTOS DE INTERÉS PARA SU ESTUDIO

Con el fin de identificar puntos relevantes de estudio a lo largo de la curva de crecimiento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, para su posterior caracterización, se realizaron curvas de crecimiento mediante conteo directo de parásitos. Para ello se tuvo la precaución de trabajar con parásitos frescos que provenían de un cultivo con al menos tres pasajes, uno cada tres días. Se partió de una densidad de parásitos de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL y se realizaron conteos directos en cámara Neubauer durante al menos 30 días consecutivos. Los ensayos se hicieron en tres cultivos independientes para obtener una curva de crecimiento representativa y cada conteo se repitió tres veces.

En la figura 12 se visualiza la curva de crecimiento obtenida (céls/mL vs Tiempo (días)) donde se marcan los cuatro puntos de interés seleccionados. Como se puede observar en la gráfica, al inicio del cultivo se observa una fase *lag* o fase de adaptación caracterizada por un crecimiento muy lento casi imperceptible de los parásitos, que aún no entraron en fase exponencial. En esta etapa, los parásitos se encuentran en un período de adaptación a las condiciones de crecimiento. Posteriormente tenemos una etapa donde los parásitos tienen un crecimiento de forma exponencial, período caracterizado por una activa duplicación celular. A continuación, se observa la fase estacionaria donde la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y acumulación de productos tóxicos. Esta fase se caracteriza por un valor constante del número de parásitos ya que la tasa de crecimiento se iguala a la tasa de muerte de parásitos. Por último, en la fase de muerte el número de parásitos empieza a descender por la falta de nutrientes y acumulación de sustancias tóxicas cuando el cultivo se hace muy viejo (Figura 12).



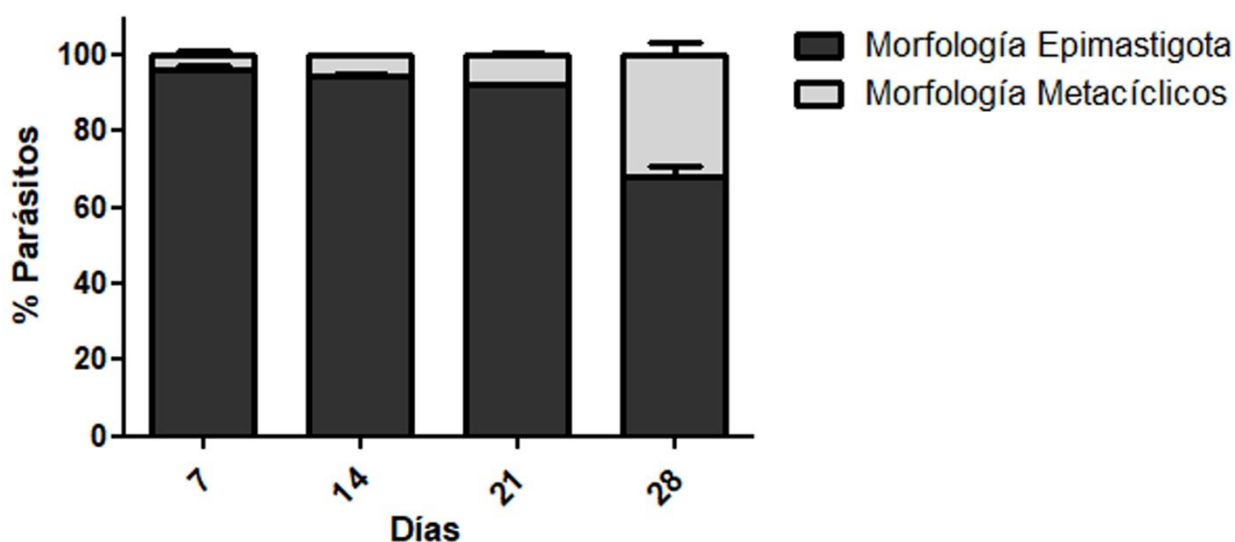
**Figura 12.** Curva de crecimiento de epimastigotas de CL Brener en medio BHI suplementado con suero fetal bovino a 28°C. Con líneas rojas se separan las diferentes etapas del crecimiento de los parásitos: fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y muerte. Con círculos verdes se indican los cuatro puntos de interés elegidos para realizar los subsecuentes estudios que permitan caracterizar las poblaciones de parásitos en las diferentes fases. Los días elegidos fueron el día 7 (representativo de la fase de crecimiento exponencial), el día 14 (correspondiente al inicio de la fase estacionaria), el día 21 (fase estacionaria media) y el día 28 (correspondiente al final de la fase estacionaria). La curva se obtuvo por conteo directo de parásitos cada 24 horas de tres cultivos independientes. Se muestra el promedio de tres experimentos cada uno por triplicado con su respectivo error estándar.

A partir de la curva de crecimiento de la figura 12, se determinaron cuatro puntos de interés para realizar la caracterización general de los parásitos creciendo *in vitro*. Se hizo énfasis en la fase estacionaria, eligiéndose tres puntos: fase estacionaria temprana (día 14), estacionaria media (día 21) y estacionaria tardía (día 28), ya que constituye una etapa importante de transición epimastigota-tripomastigota metacíclico. Además, se seleccionaron parásitos en el día 7 representativos de parásitos en fase exponencial en crecimiento activo (Figura 12)

Dado que en los cultivos las poblaciones no son homogéneas, se espera obtener además de epimastigotas o epimastigotas envejecidos un cierto número de tripomastigotas metacíclicos. Para analizar la naturaleza de las poblaciones seleccionadas en los distintos tiempos se determinó el porcentaje de tripomastigotas metacíclicos en las muestras por conteo directo usando el programa ImageJ [32] mediante observación directa de las imágenes obtenidas en el visor ZOE. La distinción de los diferentes parásitos se hizo por morfología mediante comparación con un cultivo de parásitos metacíclicos obtenidos mediante estrés nutricional.

En la gráfica de la figura 13 se observa que en los días 7 y 14, donde el parásito está en crecimiento exponencial y comienzo de la fase estacionaria respectivamente, solo se observa un 3-5% de parási-

tos con una morfología similar a tripomastigotas metacíclicos. En la población del día 21 correspondiente la fase estacionaria, podemos observar un leve aumento en el número de parásitos con morfología similar a tripomastigotas metacíclicos (8% aproximadamente), sin embargo, la mayoría de los parásitos presentan una morfología similar a la observada en el estadio epimastigota, aunque el cuerpo se ve un poco más afinado, esta morfología correspondería a epimastigotas envejecidos. Por último, en el día 28, llegando al final de la fase estacionaria, el porcentaje de parásitos con morfología tipo tripomastigotas metacíclicos aumenta sensiblemente alcanzando un 32%, y los epimastigotas restantes en el cultivo también presentan un cuerpo más afinado y se hacen más largos.

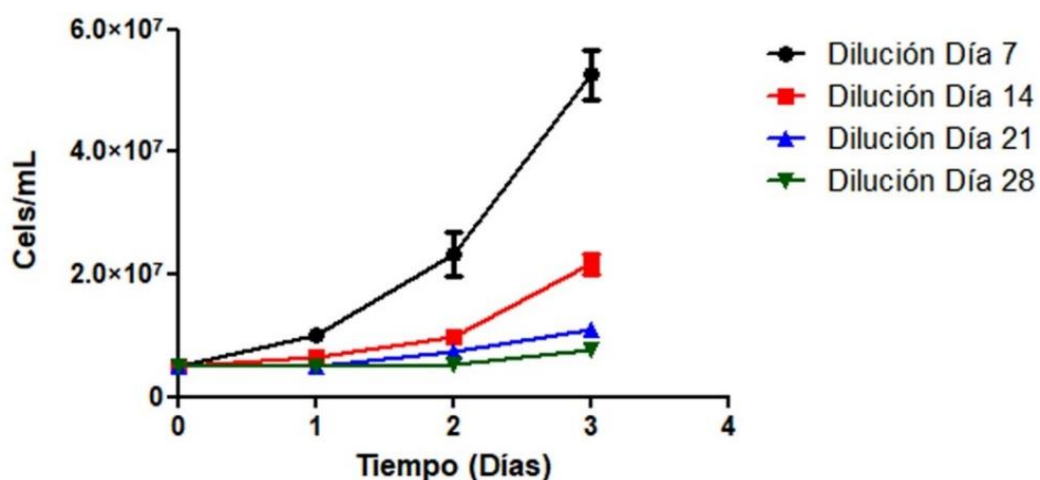


**Figura 13.** Distribución de las diferentes poblaciones de parásitos analizadas en cada punto seleccionado de la curva de crecimiento. Se realizó conteo directo sobre imágenes de cultivos obtenidos a los tiempos indicados mediante el uso del programa ImageJ [32]. Se contaron aproximadamente un promedio de 450 parásitos por punto. En gris se puede observar el porcentaje correspondiente a la población de parásitos con morfología similar a tripomastigotas metacíclicos y en negro a los parásitos que presentan una morfología típica de epimastigotas y epimastigotas envejecidos.

## 6.2 ANÁLISIS DE LA TASA DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTAS EN DIFERENTES FASES DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Con el fin de estudiar la existencia de diferencias en la tasa de crecimiento de los epimastigotas en las diferentes fases seleccionadas, se realizaron diluciones del cultivo original en cada punto de interés, volviendo a una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL y se evaluó su tasa de crecimiento por conteo directo en los siguientes 3 días. La gráfica de la figura 14 muestra el número de parásitos en función del tiempo evidenciando la tasa de crecimiento de los parásitos luego de la dilución. Los resultados obtenidos indican que la tasa de crecimiento (parásitos/mL por día) de los parásitos disminuye a medida que estos avanzan a lo largo de la fase estacionaria ya que les cuesta más retomar el crecimiento. Comparando las pendientes de los gráficos, se observa que parásitos en fase exponencial (día 7), luego de una dilución vuelven a entrar rápidamente en fase exponencial alcanzando

a los tres días de cultivo en medio BHI fresco, densidades del entorno de  $5.5 \times 10^7$  parásitos/mL con una tasa de crecimiento de  $1.78 \times 10^7$  parásitos/mL por día. Por otro lado los parásitos al inicio de la fase estacionaria (día 14), muestran una tasa de crecimiento casi un orden de magnitud más lenta de  $6.06 \times 10^6$  parásitos/mL por día alcanzando densidades del entorno de  $2 \times 10^7$  luego de tres días de crecimiento en medio fresco. Con respecto a los parásitos en fase estacionaria y fase estacionaria tardía (día 21 y 28 respectivamente), éstos presentan una tasa de crecimiento aún más reducida de  $2.46 \times 10^6$  y  $1.04 \times 10^6$  parásitos/mL por día alcanzando densidades celulares menores a  $1 \times 10^7$  parásitos/mL luego de tres días de crecimiento. Como se observa en la gráfica de la figura 14, éstos últimos se recuperan un ritmo mucho más lento, pero aún conservan la capacidad de replicarse. Por tanto, se observa con este ensayo que las tasas de recuperación en las diferentes fases analizadas se hacen cada vez más lentas lo que sugiere la existencia de diferencias a nivel del metabolismo en las poblaciones de parásitos en los diferentes puntos de la curva [33].



TASAS DE CRECIMIENTO		
	(Parásitos/mL)/(Días)	± DS
Día 7	1,78E+07	± 2,25E+06
Día 14	6,06E+06	± 1,13E+06
Día 21	2,46E+06	± 3,58E+05
Día 28	1,04E+06	± 2,16E+05

**Figura 14.** Análisis del cambio en la tasa de crecimiento de parásitos en diferentes fases de la curva de crecimiento luego de ser diluidos a una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  p/mL e incubados en medio BHI fresco. El número de parásitos en cada tiempo fue determinado por conteo directo en tres réplicas biológicas. Se muestra en el gráfico el promedio de los conteos cada 24 horas post recuperación en medio rico con su desvío estándar y en la tabla inferior se indica el valor de la pendiente del gráfico correspondiente a la tasa de crecimiento

### 6.3 ESTUDIAR CAMBIOS MORFOLÓGICOS DEL PARÁSITO DURANTE LA TRANSICIÓN A FASE ESTACIONARIA MEDIANTE MICROSCOPÍA.

Continuando con la caracterización morfológica de los parásitos en su transición a la fase estacionaria se realizó el análisis por microscopía confocal y electrónica.

Los principales cambios a nivel morfológico observados fueron el cambio en el tamaño y forma del cuerpo celular, longitud del flagelo, y posición del núcleo con respecto al kinetoplasto.

Los parásitos en fase exponencial de crecimiento (día 7), presentan la forma fusiforme característica con un kinetoplasto y flagelo ubicados anterior al núcleo como se puede ver en la figura 15. Con flechas se indica un núcleo redondeado junto al kinetoplasto que tiene forma de “coma” y en una región anterior se puede ver emerger el flagelo que se extiende a lo largo de todo el cuerpo. A medida que pasa el tiempo los nutrientes en el medio empiezan a consumirse y el parásito comienza a padecer el estrés nutricional lo que lo va a llevar a disminuir su tasa de replicación igualándola con la de mortalidad (fase estacionaria). Los parásitos al inicio de la fase estacionaria (día 14) se parecen morfológicamente a los epimastigotas del día 7, salvo que presentan un cuerpo más alargado y afinado. Con respecto al cuerpo celular, el alargamiento podría deberse a que en la fase estacionaria la expresión de genes mitocondriales aumenta y el parásito tiene que acomodar todo este material mitocondrial lo que lo lleva a aumentar su longitud corporal [34].

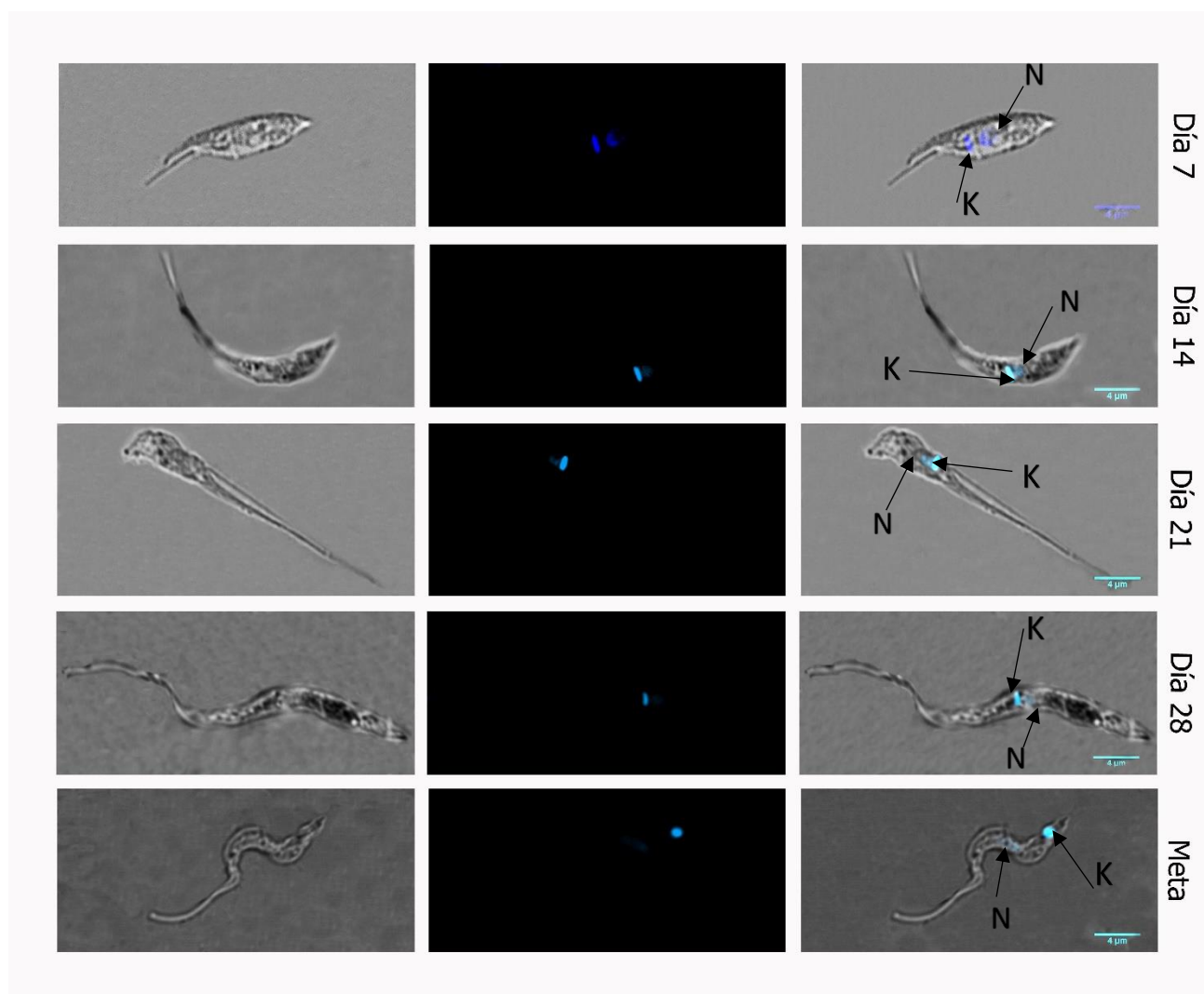
En fase estacionaria (día 21) se puede ver en los parásitos un alargamiento del cuerpo celular más acentuado, así como la presencia de un flagelo más largo. La elongación flagelar observada en parásitos en fase estacionaria y estacionaria tardía se podría vincular con un cambio pre-adaptativo previo y necesario para la diferenciación hacia la forma tripomastigota metacíclico. Este fenómeno se ha asociado a un aumento en la superficie de absorción de nutrientes [34]. La distancia entre núcleo y kinetoplasto se va haciendo más grande y este último comienza a tomar una forma redonda como se puede ver en la figura 15.

Hacia el final de la fase estacionaria, como ya se comentó anteriormente, comienzan a aparecer algunos parásitos con morfología similar a parásitos metacíclicos (aprox 35%), mientras que el resto de los parásitos adopta una conformación aún más fina y alargada creciendo en tamaño y mostrando un flagelo más largo. Además, se observan ondulaciones en el cuerpo celular y aumenta la distancia entre el núcleo y el kinetoplasto.



Los tripomastigotas metacíclicos presentan una morfología diferente a los parásitos analizados. Se puede ver la membrana ondulante característica de este estadio, y la posición del núcleo con respecto al kinetoplasto aparece invertida quedando el kinetoplasto ubicado en una zona posterior y el núcleo se localiza en la región anterior (Figura 15).

Estos cambios morfológicos, podrían estar hablando de una transición hacia un estadio pre-adaptativo donde el parásito puede tomar dos caminos para sobrevivir: diferenciarse a tripomastigotas metacíclicos infectivos en caso de estrés nutricional o volver a replicarse como epimastigotas según disponibilidad o no de nutrientes.



**Figura 15.** Representación de los cambios morfológicos observados en parásitos a lo largo de la curva de crecimiento. Imágenes de un parásito representativo de las fases de la curva que se indican a la derecha obtenidas por Microscopio Confocal Leica TCS-SP5 (aumento 100X). A la izquierda se muestra el contraste de fases, en el panel central se muestra la tinción del núcleo y kinetoplasto con DAPI y a la derecha la superposición de las dos imágenes. Con flechas se indican las posiciones del núcleo (N) y del kinetoplasto (K). La barra celeste representa 4 µm.

## 6.4 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ARN TOTAL POR PARÁSITO

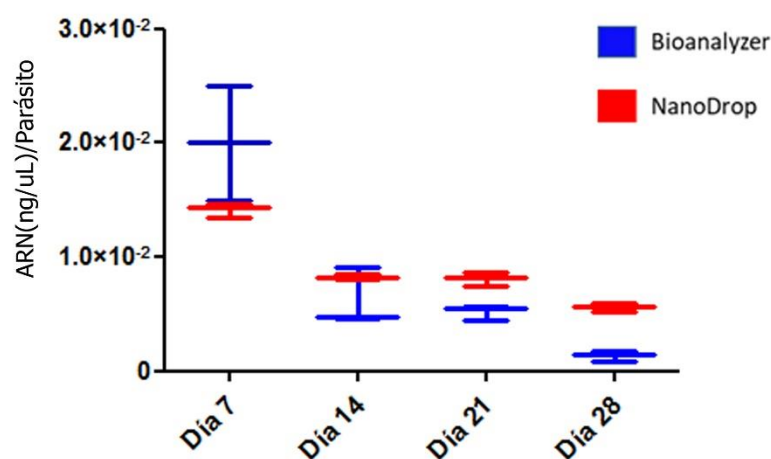
Se ha reportado que la actividad transcripcional en fase exponencial es 6 y 10 veces superior en comparación con la fase estacionaria pero que los ARNm que encontramos en esta última tienen una vida media de 3 a 7 veces mayor que los transcriptos en fase exponencial [35]. Esto puede deberse a mecanismos de ahorro de energía que utiliza el parásito cuando se encuentra en condiciones de estrés nutricional [11].

Con el fin de identificar la existencia de cambios en la cantidad de ARN total, se analizó el contenido de ARN en poblaciones de parásitos a diferentes fases de la curva de crecimiento. Para ello se extrajo el ARN total de epimastigotas en los diferentes puntos de la curva y se realizó la cuantificación del parásito mismo a través de medidas de absorbancia a 260nm en NanoDrop™ Lite Spectrophotometer de Thermo Scientific. Se calculó la cantidad de ARN por parásito dividiendo la cantidad de ARN total por el número de parásitos empleados en cada extracción (Tabla de figura 16-A). En paralelo, el ARN total fue analizado en Bioanalyzer para además analizar su calidad (Figura 16-B).

Se obtuvo un ARN de buena calidad en las tres réplicas biológicas analizadas para cada fase de la curva. En todas las muestras se puede observar las tres bandas correspondientes al ARN ribosomal y no se visualiza contaminación con ADN genómico.

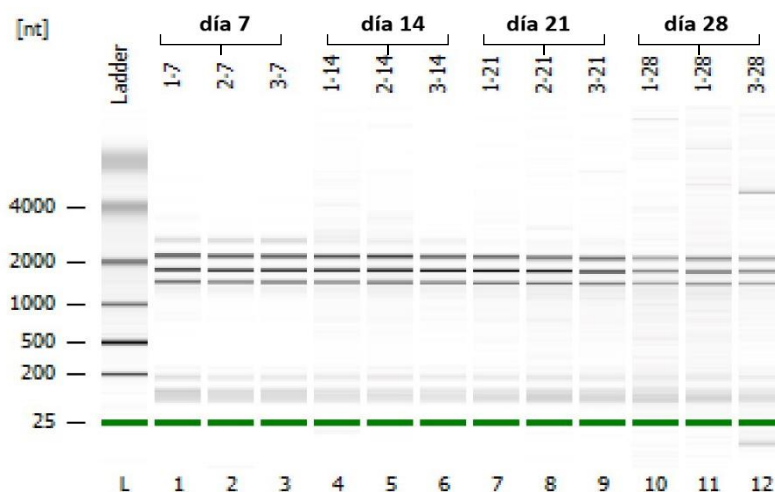
Como se puede ver en los resultados obtenidos en la figura 16-A, para ambos métodos empleados, la cantidad de ARN total por parásito alcanza su valor más alto en el día 7 donde el parásito se encuentra en su fase exponencial de crecimiento y a medida que el cultivo se hace más viejo y entra en fase estacionaria su concentración va disminuyendo hasta llegar a la concentración más baja en el día 28 donde el parásito se encuentra en el final de su fase estacionaria. Este hecho podría deberse al estrés nutricional sufrido a medida que avanza el tiempo por lo que los parásitos disminuyen su actividad transcripcional ya que entraría en un estado de latencia donde se haría necesario el ahorro de energía. La disminución en la cantidad de ARN total por parásito a medida que se avanza en la curva de crecimiento podría explicarse por la existencia de una bajada en la transcripción inducida por el estrés nutricional. Este hecho sería compensado por una estabilización adicional de los ARNm en estos estadíos tardíos, de manera de conseguir un mayor ahorro energético [11]. La regulación de estabilidad diferencial de los ARNm ha sido anteriormente reportada como un mecanismo importante para regular la expresión génica durante el desarrollo de los kinetoplastideos [35].

(A)



Cuantificación de ARN por Bioanalyzer ((ng/uL)/parásito)			Cuantificación de ARN por NanoDrop ((ng/uL)/parásito)		
	Promedio ARN/parásito	± Desvío standard		Promedio ARN/parásito	± Desvío standard
Día 7	2,01E-02	± 7,07E-03	Día 7	1,41E-02	± 5,77E-04
Día 14	6,83E-03	± 2,53E-03	Día 14	8,33E-03	± 2,57E-04
Día 21	5,58E-03	± 6,50E-04	Día 21	8,10E-03	± 6,03E-04
Día 28	1,15E-03	± 4,27E-04	Día 28	5,63E-03	± 3,75E-04

(B)

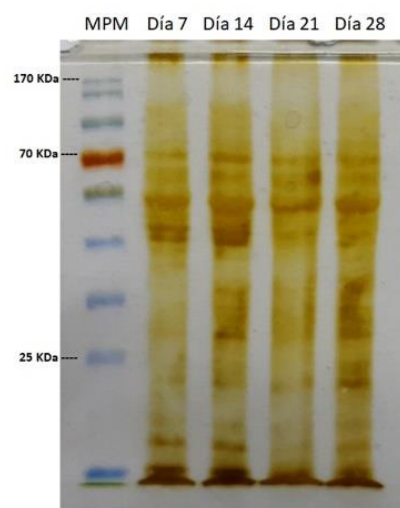


**Figura 16. A)** Cuantificación de ARN por parásito en los diferentes puntos de la curva de crecimiento seleccionados obtenidos por medidas en espectrofotómetro en gota (rojo) y por Bioanalyzer (azul). Se muestra el promedio de ARN extraído de tres cultivos independientes para cada punto de la curva. **B)** Visualización de integridad de ARN mediante bioanalyzer para los distintos puntos de la curva de crecimiento. Se muestra el resultado obtenido de tres réplicas biológicas para cada punto.

## 6.5 CAMBIOS EN EL PERFIL DE PROTEÍNAS TOTALES

Dados los cambios morfológicos observados cuando los parásitos son sometidos a estrés nutricional, es de esperar que también haya cambios en la síntesis y degradación de proteínas lo que llevaría a un perfil de proteínas diferencial en las distintas fases de la curva. Por eso la síntesis de nuevas proteínas y glicoproteínas son necesarias para la adaptación y sobrevivencia en cada una de las fases y pueden además utilizarse como principal fuente de carbono para la producción de ATP [36]. En estudios de la transición de epimastigotas en fase exponencial a fase estacionaria se ha reportado la presencia de un perfil metabólico diferente a medida que se avanza en la curva de crecimiento, lo que implicaría la expresión diferencial de proteínas asociadas con cada punto analizado [33]. En fase exponencial de crecimiento, donde el parásito se encuentra en condiciones de abundancia de nutrientes y en estado de alta tasa de duplicación, se expresa un perfil de proteínas asociadas con un metabolismo energéticamente activo principalmente enzimas del metabolismo de la glucosa y ácidos tricarboxílicos. Asimismo, en la fase estacionaria, debido al estrés nutricional sufrido por los parásitos la utilización de los aminoácidos y sus intermediarios se ve incrementada, por lo tanto se aumenta la expresión de las proteínas vinculadas con el metabolismo de los aminoácidos [33]. Por otro lado, es sabido que la expresión de proteínas de superficie también difiere entre epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos, encontrándose en estos últimos un aumento en la cantidad de proteínas vinculadas con la virulencia del parásito y con la resistencia al sistema complemento, permitiendo que la infección sea exitosa. Ejemplos de proteínas de superficie de expresión diferencial constituyen las transialidasas y las mucinas [36]

Dado estos antecedentes, para ver si existen diferencias a nivel global del perfil de proteínas, se extrajeron proteínas totales de parásitos creciendo en distintas fases de la curva de crecimiento y se analizó el perfil proteico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posterior tinción con plata. Como se puede ver en la figura 17, existen diferencias en los patrones de bandas provenientes de parásitos en diferentes fases de la curva de crecimiento, lo que sugiere que efectivamente estaría variando el repertorio de proteínas expresadas a medida que se acentúa el estrés nutricional durante la transición epimastigota-tripomastigota metacíclico.



**Figura 17.** Perfil de proteínas de las diferentes poblaciones de parásitos estudiadas. Gel de poliacrilamida 12% donde se muestra el perfil de proteínas totales en cada fase de la curva de crecimiento. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata.

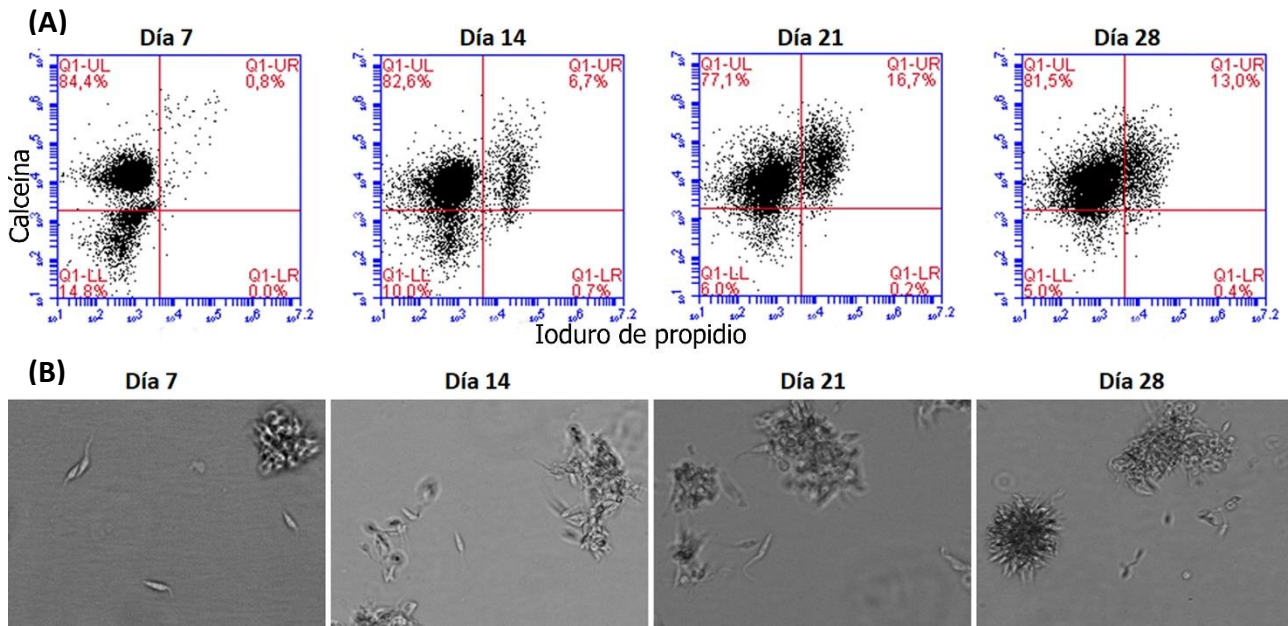
## 6.6 ANÁLISIS DE CAMBIOS EN LA RESISTENCIA DE LOS PARÁSITOS A LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO HUMANO DURANTE LA TRANSICIÓN A FASE ESTACIONARIA

La interacción entre *T. cruzi* y el sistema complemento es el principal paso de la respuesta inmune inmediata del huésped contra el parásito. Para evaluar si las diferentes poblaciones de parásitos seleccionadas a diferentes tiempos de la curva de crecimiento presentan diferencias en la resistencia al sistema complemento humano, se incubaron las mismas con suero humano sin descomplementar y en paralelo con suero humano descomplementado por calor y se analizó la viabilidad de los parásitos a las 24 horas.

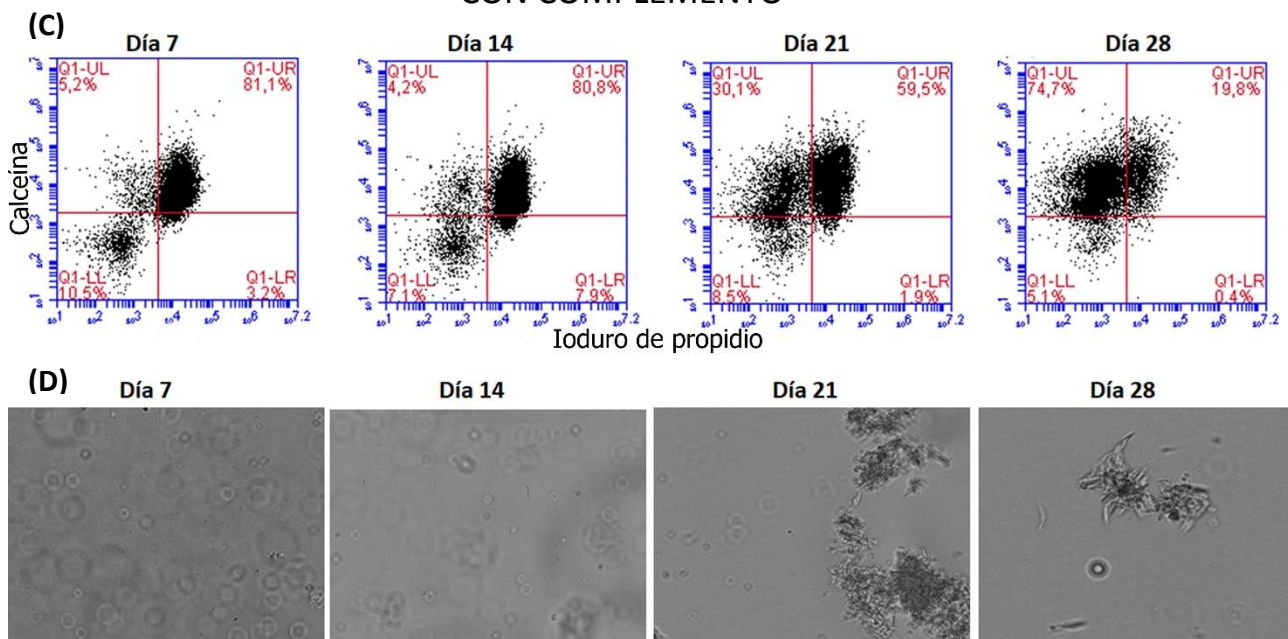
Para la determinación de la viabilidad se utilizaron los marcadores Ioduro de propidio (IP) y calceína (CA). Las células vitales presentan alta actividad esterasa intracelular, la cual se determina a través de la conversión enzimática de la calceína-AM no fluorescente en calceína polianiónica fluorescente retenida dentro de las células por parte de las células vitales. Por otro lado, el IP entra en las células y se une a ácidos nucleicos, produciendo de esta manera una fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas siendo excluido por la membrana plasmática intacta en células vivas. La determinación de la viabilidad celular se da entonces mediante la evaluación de estas propiedades físicas y bioquímicas de las células. La fluorescencia en células vitales y en células muertas fue cuantificada mediante citometría de flujo (ex/em ~495 nm/~515 nm y ex/em ~495/~635 nm respectivamente). En paralelo, se analizó la movilidad y morfología de los parásitos tratados con suero sin descomplementar y descomplementado por calor mediante observación directa en el sistema de imágenes celulares ZOE (*ZOE™ Fluorescent Cell Imager*).

En la figura 18A se observan los resultados de la marcación de CA y PI y posterior análisis por citometría de flujo obtenidos para los parásitos a las 24 horas de ser tratados con suero humano descomplementado. Se observa una variación en la distribución poblacional de los parásitos vitales marcados para CA y para IP a medida que se avanza en la curva de crecimiento. Conforme el cultivo va envejeciendo, se ve un leve aumento de la cantidad de parásitos que se están muriendo revelado como un aumento en el porcentaje de parásitos marcados con IP. Este hecho podría explicarse por la disminución en la disponibilidad de nutrientes a medida que envejece el cultivo. Las imágenes obtenidas por microscopía muestran un gran número de parásitos vivos e incluso muchos agrupados en todos los tiempos analizados (figura 18B).

## SIN COMPLEMENTO



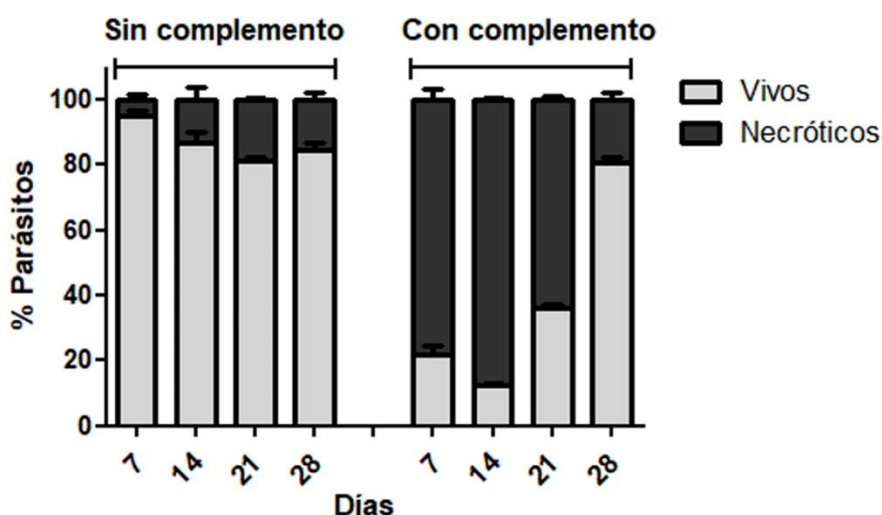
## CON COMPLEMENTO



**Figura 18.** Análisis de viabilidad de parásitos en ausencia y presencia de sistema complemento. Los parásitos fueron tratados con suero humano descomplementado y sin descomplementar. **(A)** El seguimiento de la viabilidad de los parásitos colectados en distintas etapas de la curva de crecimiento que se indican, tratados con suero humano descomplementado se realizó mediante marcado con las sondas fluorescentes CA e IP seguido de medición por citometría de flujo. **(B)** Se muestran imágenes representativas de microscopía de los cultivos en las etapas de la curva de crecimiento indicadas obtenidas con el ZOE™ Fluorescent Cell Imager. **(C)** Análisis de viabilidad de parásitos tratados con suero humano sin descomplementar tal como se describió en la parte (A). **(D)** imágenes obtenidas en el microscopio ZOE de los parásitos tratados con suero con complemento en los tiempos indicados. En cada caso, se muestra un experimento representativo de tres realizados para parásitos en cada fase de la curva.



En paralelo, los mismos parásitos en las fases de la curva de crecimiento indicadas, fueron crecidos en presencia de suero humano sin descomplementar y se realizó de la misma forma el seguimiento de la viabilidad de los mismos. A las 24 horas posteriores al tratamiento con suero sin descomplementar, ya se ve un alto porcentaje de células muertas (81%) representadas por la población IP positiva y un bajo porcentaje de células únicamente CA positivas (5,2%) (Figura 18C). Un comportamiento similar se observa para los epimastigotas que recién entran en fase estacionaria (día 14), lo cual sugiere que hasta el inicio de la fase estacionaria, los parásitos no han adquirido ninguna estrategia para evadir el efecto del sistema complemento. En ambos casos este hallazgo se confirma en las imágenes obtenidas por microscopía donde se observan la gran mayoría de los parásitos muertos y redondeados (Figura 18D). Cuando los parásitos se encuentran en fase estacionaria, ya en el día 21 de crecimiento, se observa la aparición de una población (30%) CA positiva, resistente a la exposición al sistema complemento humano (Figura 18C). Al analizar las imágenes obtenidas en el ZOE™ Fluorescent *Cell Imager* también se observa un porcentaje mayor de parásitos viables móviles (Figura 18D). Llegando al final de la fase estacionaria en el día 28, la población de parásitos CA positivos (74%) se hace aún mayor (Figura 18C). Estos hallazgos sugieren que los parásitos a medida que avanzan en la fase estacionaria van adquiriendo estrategias para evadir el sistema complemento y hacerse resistentes. En este sentido estos epimastigotas envejecidos compartirían características de los tripomastigotas en cuanto a la resistencia al sistema complemento lo cual sugiere que los parásitos estarían entrando en una etapa de adaptación previa a su diferenciación en tripomastigotas metacíclicos.



**Figura 19.** Gráfico de comparación que representa los porcentajes de parásitos para CA e IP positivos de tres experimentos independientes promediados para los tratamientos con y sin complemento. En gris corresponde a parásitos vivos y el negro a los parásitos necróticos



Los porcentajes promedio de parásitos IP y CA positivos de tres experimentos independientes se muestran en la figura 19. En el caso del tratamiento con suero humano descomplementado, se observa un alto porcentaje de parásitos vivos para todas las fases de la curva de crecimiento con un aumento gradual del porcentaje de células que se están muriendo a medida que el cultivo se va haciendo cada vez más viejo y algunos parásitos comienzan a morir. Por otro lado cuando se los trata con suero sin descomplementar se observa que el porcentaje de parásitos vivos es muy bajo en las primeras etapas de la curva de crecimiento pero aumenta en la fase estacionaria, alcanzando su mayor porcentaje en la fase estacionaria tardía (día 28) Este número es comparable y muy similar al obtenido cuando se tratan los parásitos sin complemento.

Se observa cuando se realiza el tratamiento con complemento una doble marcación IP y CA positivas. Esto podría explicarse por la formación del complejo MAC (complejo de ataque a membrana), uno de los mecanismos de acción que tiene el sistema complemento. El MAC se forma típicamente en la superficie de un agente patógeno invasor como resultado de la activación del sistema del complemento. La estructura del MAC actúa como un canal o poro a través de la membrana que permite la libre difusión de moléculas en ambos lados de la misma, lo que distorsiona su ambiente interno matándola rápidamente [37]. La doble marcación positiva se produce por la entrada de IP aun cuando parte de la concentración de CA se mantiene dentro la célula. Esta marcación CA positiva se perdería lentamente por la formación de los poros creados por el complemento. Posiblemente si se hubiera seguido la viabilidad en horas posteriores se esperaría marcación positiva únicamente para IPya que los parásitos estarían muertos completamente.

## 7 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

### 7.1 CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó una caracterización general de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* creciendo *in vitro* en las diferentes fases de la curva de crecimiento haciendo énfasis en la fase estacionaria de la misma y estableciendo una comparación con parásitos creciendo en fase exponencial y con tripomastigotas metacíclicos.

Se determinaron 4 puntos de interés a partir de la curva de crecimiento realizada correspondiente a la fase exponencial (día 7) y fase estacionaria (días 14,21 y 28) en los cuales se realizaron todos los estudios posteriores.

Las tasas de crecimiento en las diferentes fases analizadas se hacen cada vez más lentas, alcanzando un valor promedio de  $2.46 \times 10^6$  parásitos/mL por día en la fase estacionaria (día 21).

Los cambios morfológicos a lo largo de la curva de crecimiento están vinculados con el alargamiento del cuerpo celular y presencia de flagelo más largos. También se observó un aumento en la distancia entre núcleo y kinetoplasto.

La cantidad de ARN total por parásito disminuye a medida que se avanza en la curva de crecimiento, con valores del orden  $10^{-2}$  en fase exponencial y el orden de  $10^{-3}$  en fase estacionaria (día 21).

Hay variaciones en el repertorio de proteínas totales a medida que se acentúa el estrés nutricional durante la transición epimastigota-tripomastigota metacíclico.

Los parásitos a lo largo de la curva de crecimiento se vuelven más resistentes al complemento notándose un aumento de células viables.

La fase estacionaria de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* creciendo *in vitro*, se caracteriza por tener parásitos con una tasa de crecimiento más lenta que los epimastigotas en fase exponencial pero que igualmente crecen cuando son puestos nuevamente en un medio de cultivo nuevo. Estos parásitos contienen un cuerpo celular alargado y presencia de un flagelo más largo, además la distancia entre núcleo y kinetoplasto aumenta pero no hay variación en su posición. La concentración de ARN total por parásito es baja debido posiblemente al estrés nutricional sufrido lo que llevaría a

una disminución de su actividad transcripcional. Con respecto a sus proteínas se observó que presentan un perfil diferente que puede asociarse con un cambio a nivel metabólico. Por último se determinó que los parásitos en fase estacionaria son más resistentes al complemento debido a que van adquiriendo estrategias para evadirlo.

Como se postuló en nuestra hipótesis los parásitos en fase estacionaria de crecimiento cobran relevancia porque durante esta etapa, como se puede observar en nuestros estudios, comienzan a manifestarse muchos de los primeros cambios preadaptativos que sufre la forma epimastigota para transformarse en tripomastigota metacíclico.

## 7.2 PERSPECTIVAS

Estudiar la variación de expresión de proteínas de resistencia al complemento (CRT, T-DAF, TcCRP, gp58/68, entre otras) y de proteínas de superficie (Transialidasas, mucinas, entre otras) a lo largo de la transición epimastigota-epimastigota envejecidos

Realizar análisis bioinformático de transcriptomas realizado por secuenciación masiva para cada punto de la curva de crecimiento seleccionado.

Seleccionar genes candidatos involucrados con la transición hacia parásitos tardíos y profundizar en el estudio de las vías de señalización involucradas.

Obtener marcadores moleculares asociados con esta transición.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- [1] C. Chagas, “Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem,” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 1, no. 2, pp. 159–218, 1909.
- [2] WHO, “OMS | La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana),” *WHO*, 2017. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>. [Accessed: 02-Nov-2017].
- [3] PAHO, “PAHO - Enfermedad de Chagas - Pan American Health Organization,” 2017. [Online]. Available: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es). [Accessed: 02-Nov-2017].
- [4] Cerecetto, “Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos,” 2012.
- [5] M. C. P. Nunes, W. Dones, C. A. Morillo, J. J. Encina, and A. L. Ribeiro, “Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 62, no. 9, pp. 767–776, 2013.
- [6] L. H. Malik, G. D. Singh, and E. A. Amsterdam, “The epidemiology, clinical manifestations, and management of chagas heart disease,” *Clin. Cardiol.*, vol. 38, no. 9, pp. 565–569, 2015.
- [7] A. Rassi, A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, “Chagas disease,” *Lancet*, vol. 375, no. 9723, pp. 1388–1402, 2010.
- [8] K. M. Tyler and D. M. Engman, “The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited,” vol. 31, pp. 472–481, 2001.
- [9] D. E. Teixeira, M. Benchimol, P. H. Crepaldi, and W. De Souza, “Atlas didático Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*,” p. 50, 2011.
- [10] K. C. F. Lidani, L. Bavia, A. R. Ambrosio, and I. J. de Messias-Reason, “The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. APR, pp. 1–14, 2017.

- [11] R. Hernández, A. M. Cevallos, T. Nepomuceno-Mejía, and I. López-Villaseñor, "Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis," *Parasitol. Res.*, vol. 111, no. 2, pp. 509–514, 2012.
- [12] W. Souza, "Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 8, no. 4, pp. 269–285, 2002.
- [13] W. De Souza, "A Short Review on the Morphology of *Trypanosoma cruzi*: From 1909 to 1999," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 94, no. SUPPL. 1, pp. 17–36, 1999.
- [14] El-Sayed *et al.*, "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease," vol. 309, no. July, pp. 409–15, 2005.
- [15] N. M. Choi, J. & El-Sayed, "Functional genomics of trypanosomatids," *Parasite Immunol.*, vol. 34, no. 2–3, pp. 72–79, 2012.
- [16] I. C. Almeida, "Subcellular Proteomics and Global Analysis of Posttranslational Modifications to Study Functional Roles of *Trypanosoma cruzi* Molecules," *Open Parasitol. J.*, vol. 4, no. 1, pp. 167–177, 2010.
- [17] S. Kramer, "Molecular & Biochemical Parasitology Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control : The case of kinetoplastids," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 181, no. 2, pp. 61–72, 2012.
- [18] P. Smircich, D. Forteza, N. M. El-Sayed, and B. Garat, "Genomic Analysis of Sequence-Dependent DNA Curvature in *Leishmania*," *PLoS One*, vol. 8, no. 4, pp. 1–9, 2013.
- [19] P. Respuela, M. Ferella, and A. Rada-iglesias, "Histone Acetylation and Methylation at Sites Initiating Divergent Polycistronic Transcription in *Trypanosoma cruzi* \* □," vol. 283, no. 23, pp. 15884–15892, 2008.
- [20] S. Martinez-Calvillo, J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martinez, R. G. Manning-Cela, and E. E. Figueroa-Angulo, "Gene Expression in Trypanosomatid Parasites," vol. 2010, 2010.
- [21] C. E. Clayton *et al.*, "NEW EMBO MEMBER'S REVIEW Life without transcriptional control? From fly to man and back again," *EMBO J.*, vol. 21, no. 8, pp. 1881–1888, 2002.

- [22] C. Gomez, "Regulation of gene expression in protozoa parasites," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, 2010.
- [23] S. Haile and B. Papadopoulou, "Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 10, no. 6, pp. 569–577, 2007.
- [24] G. Mair *et al.*, "A new twist in trypanosome RNA metabolism : cis -splicing of pre-mRNA," *Rna*, vol. 6, pp. 163–169, 2000.
- [25] D. Ricklin, "Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis," vol. 11, no. 9, pp. 785–797, 2010.
- [26] I. Cestari and M. I. Ramirez, "Inefficient Complement System Clearance of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes Enables Resistant Strains to Invade Eukaryotic Cells," vol. 5, no. 3, 2010.
- [27] A. Ferreira, "Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host – parasite interplay," vol. 27, no. 3, pp. 115–122, 2011.
- [28] M. Beucher *et al.*, "Sequence Diversity of the *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein Family □ †," vol. 76, no. 2, pp. 750–758, 2008.
- [29] K. A. Norris and J. E. Schimpf, "Biochemical Analysis of the Membrane and Soluble Forms of the Complement Regulatory Protein of *Trypanosoma cruzi*," vol. 62, no. 1, pp. 236–243, 1994.
- [30] I. Cestari *et al.*, "*Trypanosoma cruzi* Immune Evasion Mediated by Host Cell-Derived Microvesicles," 2012.
- [31] B. Zingales *et al.*, "*Trypanosoma cruzi* genome project : biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener," vol. 68, pp. 159–173, 1997.
- [32] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nat. Methods*, vol. 9, p. 671, Jun. 2012.

- [33] M. J. Barisón *et al.*, "Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 21, pp. 8964–8977, 2017.
- [34] K. M. Tyler and D. M. Engman, "Flagellar Elongation Induced by Glucose Limitation Is Preadaptive for *Trypanosoma cruzi* Differentiation," vol. 278, no. February, pp. 269–278, 2000.
- [35] A. M. Cevallos, M. Pérez-Escobar, N. Espinosa, J. Herrera, I. López-Villaseñor, and R. Hernández, "The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 246, no. 2, pp. 259–264, 2005.
- [36] L. Berná, M. L. Chiribao, G. Greif, M. Rodriguez, F. Alvarez-Valin, and C. Robello, "Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*," *PeerJ*, vol. 5, p. e3017, 2017.
- [37] H. J. Muller-Eberhard, "The killer molecule of complement," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 85, no. SUPPL. 1, 1985.