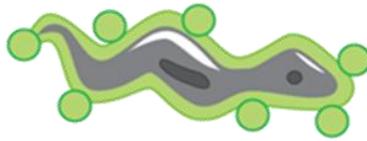


Interacción célula hospedera-parásito mediada por microvesículas de *Trypanosoma cruzi*



Lic. Florencia Cabrera

Orientador: Dr. Alfonso Cayota
Laboratorio de Genómica Funcional
Institut Pasteur de Montevideo

Tribunal
Dra. Mónica Marín
Dra. Ana Ramón
Dra. Andrea Medeiros



Índice

Resumen	1
1. Introducción.....	2
1.1 Vesículas extracelulares y su rol en la comunicación celular.....	3
1.1.1 Biogénesis y liberación de MVs	3
1.1.2 Composición de las MVs.....	5
1.1.3 Interacción con células blanco y funciones.....	7
1.2 MVs en microorganismos y organismos patógenos	8
1.3 <i>T. cruzi</i> como organismo de estudio	10
1.3.1 Ciclo de vida.....	10
1.3.2 Regulación de la expresión génica	12
1.3.1 MVs de <i>T. cruzi</i>	14
1.4 Pequeños ARNs derivados de ARN de transferencia (tsRNAs)	15
1.4.1 Clasificación y biogénesis	16
1.4.1.1 Mitades de ARNt (tRNA halves).....	16
1.4.1.2 Fragmentos de ARNt (tRFs)	19
2. Objetivos	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
3. Materiales y Métodos	23
3.1 Cultivo de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	23
3.2 Cultivo de línea celular HeLa	23
3.3 Obtención y purificación de microvesículas de <i>T. cruzi</i>	23
3.4 Electroporación de MVs de <i>T. cruzi</i>	24
3.5 Puesta a punto de las condiciones de incubación de células hospederas con MVs de <i>T. cruzi</i>	24
3.5.1 Determinación del tiempo de incubación	24
3.5.2 Determinación de la relación MVs/célula	25
3.6 Ensayos de viabilidad	26
3.7 Análisis de las vías de entrada de las MVs a la célula hospedera	26

3.8 Transfección de células HeLa con pequeños ARNs sintéticos.....	27
3.9 Ensayos de microarreglos	28
3.9.1 Obtención de las muestras.....	28
3.9.1.1 Células tratadas con MVs.....	28
3.9.1.2 Células transfectadas con tsRNAs.....	28
3.9.2 Purificación y procesamiento del ARN	28
3.9.3 Hibridación, lavado y escaneo de los microarreglos.....	29
3.9.4 Análisis de los resultados.....	29
3.10 PCR en tiempo real (qPCR)	30
4. Resultados y Discusión.....	31
4.1 Puesta a punto de las condiciones de incubación de las MVs de <i>T. cruzi</i> con la célula hospedera.....	32
4.1.1 Ensayo de viabilidad de células incubadas con MVs de <i>T. cruzi</i>	34
4.2 Análisis de las vías de entrada de las MVs de <i>T. cruzi</i> a la célula hospedera..	36
4.3 Análisis de expresión génica de células tratadas con MVs de <i>T. cruzi</i> : ensayos de microarreglos.....	43
4.3.1 Análisis ontológico.....	46
4.3.2 Análisis de vías.....	51
4.3.2.1 Vías del complemento y la coagulación.....	52
4.3.2.2 Vía de receptores tipo NOD (NLR)	54
4.3.2.3 Vía de señalización por IL-1	56
4.3.2.4 Vía de señalización por Rho GTPasas y reordenamiento del citoesqueleto de actina	57
4.3.2.5 Metaloproteinasas de matriz.....	60
4.3.2.6 Vía de señalización de Wnt.....	61
4.4 Transfección de células HeLa con tsRNAs presentes en las MVs de <i>T. cruzi</i> : ensayos de viabilidad y análisis de microarreglos	69
4.4.1 Eficiencia de transfección y viabilidad.....	69
4.4.2 Análisis de expresión génica por microarreglos.....	71
4.5 Validación de los resultados de microarreglos mediante RT-PCR en tiempo real (qPCR)	76
5. Conclusiones y perspectivas.....	79

6. Referencias bibliográficas	81
7. Anexos	91

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a las agencias financiadoras e instituciones que permitieron la realización de esta tesis: PEDECIBA, Institut Pasteur de Montevideo, Facultad de Ciencias, ANII y CSIC.

Al tribunal por acceder a corregir la tesis, su buena voluntad y paciencia.

A las distintas unidades y miembros del Institut Pasteur que estuvieron de alguna forma involucradas en esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Genómica Funcional, Braulio, Juli, Cata, Fer, Rosa y JP por los 4 años y medio que pasamos juntos, porque de cada uno de ellos aprendí algo y por aquellos que fueron la motivación y el apoyo en los momentos más difíciles. A Alfonso por permitirme entrar en este grupo.

A las almejitas y los compañeros de la salita, que junto con los amigos del Lab de Genómica Funcional son lo más gratificante de mi experiencia en el IPMon, por su apoyo continuo y los mates hasta tarde.

A los compañeros de la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias, de la que formo parte desde hace casi dos años, en la que he aprendido mucho, y donde me he sentido muy apreciada y valorada. Por su paciencia y entendimiento durante el proceso de llevar adelante esta tesis, por sus aportes y consejos.

A mi mamá, mi papá, mi hermana y Eduardo, que siempre me han apoyado, desde el comienzo de esta carrera, y han sido el soporte fundamental para que este proceso haya podido completarse. A mi familia en general por su interés siempre, y en especial a mi abuelo Toto que siempre me impulsó demostrándome su orgullo, y que sería feliz viendo esta etapa culminada. A la familia de Rafa, quienes me han hecho sentir siempre muy bien recibida y me han acompañado en este proceso

A mis amigos de la vida y de la Facultad, por siempre darme para adelante y compartir este proceso conmigo.

A Rafa, por su paciencia, apoyo y ayuda constantes y por llenarme de felicidad con su amor.

Resumen

La producción y liberación de vesículas extracelulares es actualmente reconocida como un fenómeno que tiene lugar tanto en células procariotas como eucariotas, con lo que se lo considera un aspecto universal de la vida celular. Si bien la atención se ha centrado en las vesículas producidas por células humanas, cada vez se cuenta con más información sobre lo que ocurre en eucariotas inferiores. En particular, se conoce el hecho de que varios organismos parásitos generan vesículas de distintos tipos, con diversos efectos sobre sus células hospederas. En el caso de *Trypanosoma cruzi*, se ha visto que favorecen el proceso de infección, por mecanismos aún no completamente descritos. Estudios recientes del Laboratorio de Genómica Funcional describen el contenido de pequeños ARNs de las mismas y muestran que transportan miembros de la familia de pequeños ARNs derivados de ARN de transferencia, la principal clase de pequeños ARNs presentes en este parásito, que carece de las vías canónicas de silenciamiento mediado por estos.

En este contexto, el presente proyecto buscó estudiar la interacción que tiene lugar entre el parásito y la célula hospedera a través de vesículas secretadas, y en particular evaluar cuáles son los efectos que éstas tienen, analizando los cambios en la expresión génica mediante microarreglos. Asimismo, se analizó el posible rol de los pequeños ARNs derivados de ARN de transferencia transportados en las mismas.

Los resultados obtenidos indican que las vesículas secretadas son capaces de modular la expresión génica de las células hospederas, con efectos más pronunciados durante las primeras horas que siguen a la interacción. Diversos procesos celulares se ven afectados, en algunos casos con posibles efectos beneficiosos para el parásito en el contexto de la infección. Asimismo, se logró verificar que los pequeños ARNs derivados de ARN de transferencia de *T. cruzi* son capaces de regular la expresión de ciertos genes celulares. En conjunto los resultados obtenidos permiten contar con una descripción general de lo que ocurre en la célula hospedera en respuesta a las vesículas extracelulares de *T. cruzi*, contribuyendo así al conocimiento de la biología de la infección y aportando nuevos actores moleculares en la biología de la interacción célula hospedera-parásito.

1. Introducción

La evolución de organismos multicelulares impuso sobre las células la necesidad de desarrollar mecanismos que les permitan comunicarse entre sí. Vías de comunicación eficientes son claves para la coordinación de la regulación de procesos tales como la proliferación, apoptosis y diferenciación a distintos tipos celulares especializados [1]. Si bien estos mecanismos han sido principalmente estudiados en organismos multicelulares, es cada vez más evidente que la comunicación en organismos unicelulares es un fenómeno que tiene lugar de forma frecuente. La capacidad de éstos de producir, recibir y procesar información les permite comportarse como entidades multicelulares, lo cual puede representar una ventaja en ambientes complejos y cambiantes [2]. Asimismo, no es sorprendente que microorganismos patógenos sean capaces de explotar estas vías de comunicación para enviar mensajes a sus células hospederas.

Existen tres modalidades principales de comunicación intercelular: 1) la producción y liberación de mediadores solubles (como hormonas, citoquinas u óxido nítrico) que actúan en células vecinas a distancias variables; 2) moléculas de superficie que se agrupan y contactan directamente con otras células o la matriz extracelular (como es el caso de las integrinas) y 3) uniones que conectan directamente una célula a la otra, tales como las uniones gap [3].

Más recientemente, ha sido descrita la producción y liberación al medio extracelular de vesículas membranosas, que transportan tanto material genético como proteico entre células, siendo capaces así de transmitir mensajes, surgiendo por lo tanto como un nuevo mecanismo de comunicación intercelular, tanto dentro de un mismo organismo como entre entidades distintas [4]. Esto último es de particular relevancia en el contexto de la interacción entre un parásito y su célula hospedera, especialmente para el entendimiento de la biología de la infección y las diferentes señales que hacen que esta sea exitosa.

1.1 Vesículas extracelulares y su rol en la comunicación celular

Las células (tanto eucariotas como procariotas) liberan al medio extracelular una variedad de vesículas membranosas de diversos tamaños y orígenes. En particular, para células eucariotas, además de los conocidos cuerpos apoptóticos, se producen exosomas y ectosomas, los cuales destacan por la creciente atención que han recibido en los últimos años [5]. Los primeros tienen un diámetro de entre 30-100 nm y son de origen endosomal, siendo liberados por exocitosis a partir de los cuerpos multivesiculares. Los ectosomas son de un tamaño mayor (100-1000 nm) y son generados a nivel de la membrana plasmática. Ambos tipos de vesículas son liberadas tanto de forma constitutiva como en respuesta a estímulos [4]. A lo largo de este trabajo nos referiremos al conjunto de exosomas y ectosomas como microvesículas (MVs), en parte debido a que se trabajó con una combinación de ambas. Originalmente se pensaba que estas MVs eran simplemente un artefacto, producto del daño celular, cuya única función era la de permitir a la célula eliminar sus desechos. Actualmente se cuenta con evidencia suficiente para afirmar que las MVs participan en importantes procesos biológicos y que son importantes mediadores de la comunicación intercelular [6-7]. Una representación de los distintos tipos de MVs, en la que se muestra su origen y la interacción con la célula blanco se presenta en la figura 1.

1.1.1 Biogénesis y liberación de MVs

Como fue mencionado anteriormente, los exosomas son generados en los cuerpos o endosomas multivesiculares (MVEs, del inglés multivesicular endosomes) como vesículas intraluminales (ILVs, del inglés intraluminal vesicles), y liberados por la fusión de los primeros con la membrana plasmática. La formación de los MVEs implica la segregación del contenido de los futuros exosomas sobre una región de la membrana endosomal y la posterior invaginación de vesículas de tamaño variable hacia el lumen de un endosoma temprano. A diferencia de los MVEs destinados a la degradación en el lisosoma, aquellos que se fusionarán con la membrana plasmática presentan una composición lipídica diferente, enriquecida en colesterol. Sin embargo, existen evidencias de que la misma maquinaria involucrada en la formación de MVEs que irán hacia el lisosoma, también participa en la formación de los MVEs destinados a exocito-

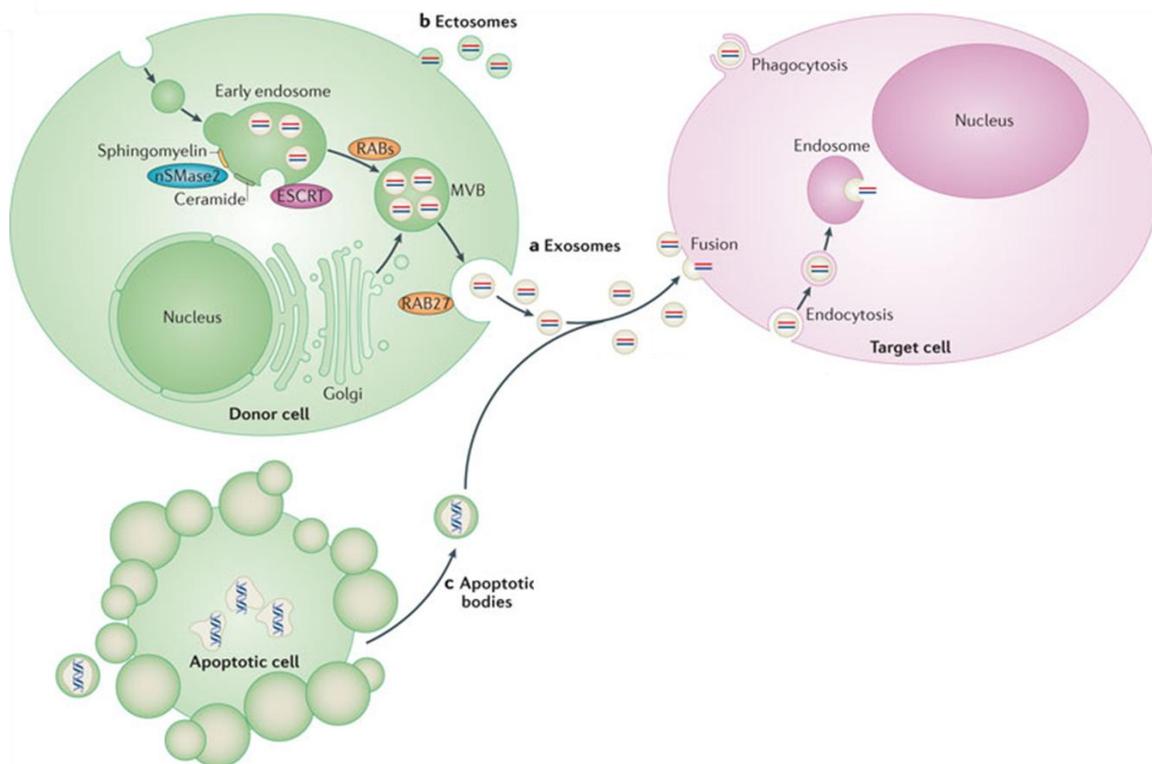


Figura 1. Vesículas extracelulares. Se muestran de forma esquemática los distintos tipos de vesículas extracelulares producidas por una célula eucariota, representada en verde. Por un lado se observa la liberación de exosomas (“a: Exosomes”) a partir de cuerpos multivesiculares (MVB en la figura) así como la formación de ectosomas a nivel de la membrana plasmática (“b: Ectosomes”). Se muestra también en verde una célula apoptótica generando los típicos cuerpos apoptóticos (“c: Apoptotic bodies”). Finalmente se presenta en rosado una célula blanco o receptora, internalizando vesículas y su contenido por diferentes mecanismos. Tomado y modificado de [8].

sis. Esta maquinaria se encuentra muy conservada, y se organiza en cuatro complejos multiproteicos denominados complejos clasificadores endosomales responsables del transporte o ESCRT 0, I, II y III (del inglés endosomal sorting complex responsible for transport). Los primeros tres reconocen proteínas de membrana ubiquitinadas, secuestrándolas en la membrana endosomal, al tiempo que ESCRT-III se encarga de la formación y escisión de las ILVs. Se ha visto que la depleción de ciertos miembros de estos complejos lleva a una disminución de la formación de exosomas en distintos tipos celulares, con lo que se los ha asociado a la formación de los MVEs, si bien es posible que la selección de las proteínas destinadas a exosomas no dependa de la ubiquitinación. Mecanismos independientes de ESCRT han sido propuestos para la formación de MVEs en ciertos tipos celulares. Uno de estos involucra a la enzima esfingomielinasa, encargada de la producción de ceramida, la cual se encuentra en grandes cantidades en los exosomas. Asimismo, las tetraspaninas, también muy abundantes en los exosomas, han sido asociadas con la formación de ILVs [9-10]. No se

cuenta aún con una descripción completa de los mecanismos por los cuales se generan los MVEs, tanto dependientes como independientes de ESCRT, y cuanta colaboración o superposición entre estos existe.

Los mecanismos por los cuales se generan los ectosomas han sido incluso menos estudiados que aquellos involucrados en la formación de exosomas. Se propone que dominios específicos son generados a nivel de la membrana plasmática, a los cuales son reclutadas aquellas proteínas de membrana destinadas a formar parte de los ectosomas. Asimismo, se da una acumulación en estos puntos de proteínas citosólicas, ARN mensajeros y pequeños ARNs, gracias a ciertas proteínas que funcionan como anclas, emergiendo desde la membrana hacia el citosol. La evaginación hacia el espacio extracelular de estos dominios de membrana plasmática junto con su carga de ARN y proteínas requiere del desensamblado del citoesqueleto, y la escisión dependería de actina-miosina, así como la acción de pequeñas GTPasas y posiblemente ESCRT [11].

1.1.2 Composición de las MVs

La composición de las MVs es indicativa tanto de su origen (endosomal o a partir de la membrana plasmática) como del tipo celular del que fueron secretadas, así como también puede hablarnos de su posible rol fisiológico o sus células blanco [12]. Los exosomas típicamente presentan proteínas asociadas a endosomas, tales como RabGTPasas o SNAREs. Proteínas que se concentran tanto en endosomas como en la membrana plasmática, como es el caso de la tetraspaninas, también se encuentran enriquecidas en MVs, así como lo hacen proteínas asociadas a rafts o balsas lipídicas (por ejemplo, flotilina). El mecanismo por el cual proteínas citosólicas son específicamente incluidas en los exosomas aun no se ha dilucidado, pero se cree que podría involucrar la interacción de proteínas de la membrana exosomal con chaperonas celulares, encargadas de la selección de las mismas. En cuanto a su composición lipídica, los exosomas se ven enriquecidos (en relación a la membrana plasmática) en colesterol, esfingomielina y derivados de la ceramida. Finalmente, se ha visto que los exosomas presentan una composición glucídica diferencial con respecto a las células de las que se originaron [13]. Al igual que en otros aspectos, se cuenta con

menos información sobre la composición de proteínas, lípidos y carbohidratos de los ectosomas [9].

Un aspecto de las MVs que resulta de particular interés es el hecho de que almacenan material genético como ARN mensajero e incluso pequeños ARN, los cuales se incorporan selectivamente en éstas y son funcionales en las células blanco [14]. Adicionalmente, otros pequeños ARNs no codificantes, entre los que se encuentran aquellos derivados de ARN de transferencia (descritos en detalle en secciones posteriores) también se han detectado dentro de MVs [15-16]. El mecanismo por el cual tiene lugar la incorporación selectiva de moléculas de ARN a las MVs aun no se conoce completamente. Es posible que existan motivos en sus secuencias que de cierto modo los etiqueten con este destino [9]. Asimismo, una serie de trabajos de finales del 2009 demuestran que componentes fundamentales de la maquinaria de silenciamiento como la proteína GW182 (una de las proteínas del complejo RISC) se encuentran íntimamente relacionados con los MVEs [17], con lo cual podrían formar parte del sistema de selección. Un esquema representativo de una MV y sus principales componentes puede verse en la figura 2.

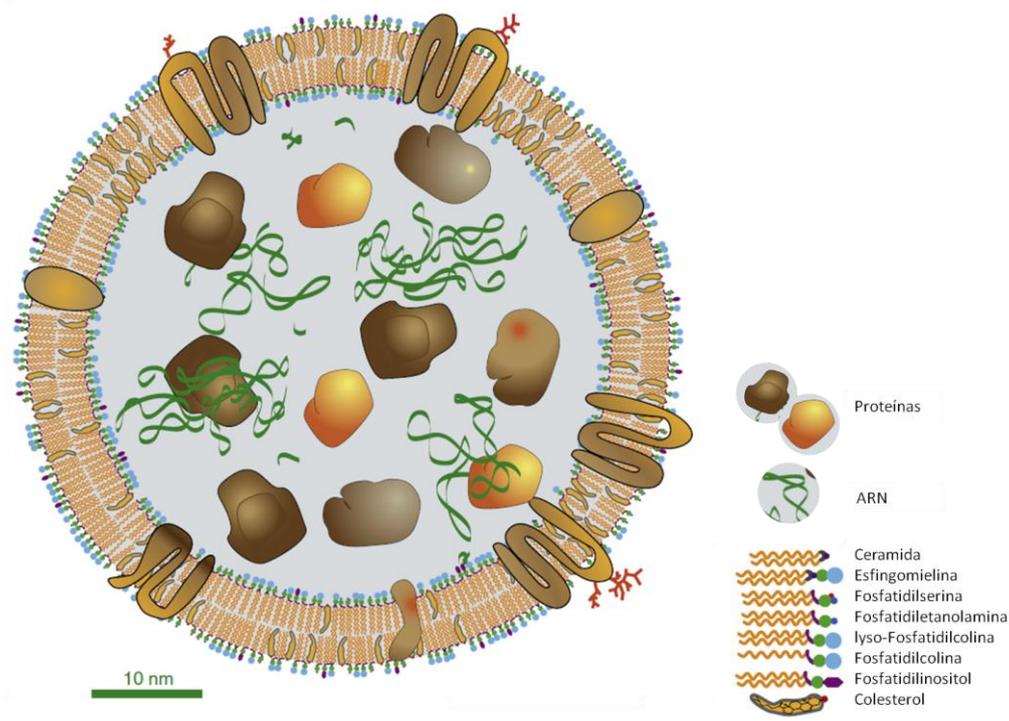


Figura 2. Representación de una MV. Esquema de una MV (en este caso un exosoma), donde se muestra la composición lipídica de la membrana y el contenido proteico y de ARN, manteniendo las relaciones de tamaño. Las ramas rojas representan polisacáridos. Adaptado de [7].

1.1.3 Interacción con células blanco y funciones

Las funciones reportadas para las MVs son múltiples, y se enmarcan en grandes procesos, tanto fisiológicos como patológicos. Una de las funciones inicialmente descritas de las MVs era la de presentación de antígenos, para la estimulación de la respuesta inmune. Las células del sistema inmunitario liberan MVs en respuesta a señales pro-inflamatorias, y células infectadas también producen MVs con el fin de provocar una respuesta protectora [9-10]. Existen evidencias de que podrían tener un rol durante el desarrollo, especialmente debido a que en ciertos casos se ha visto que transportan proteínas típicamente asociadas a este proceso como Wnt y Sonic Hedgehog [10]. Se ha determinado también que células del sistema nervioso producen MVs, que pueden ser importantes para el crecimiento, la angiogénesis y la formación de mielina. Asimismo, están asociadas con enfermedades del sistema nervioso central, dado que se ha reportado que transportan proteínas priónicas y péptidos β -amiloides [9-10].

Como fue mencionado, participan en procesos patológicos, particularmente en cáncer, donde se cree que tienen un rol fundamental en la transformación maligna, la progresión tumoral y metástasis, dado su rol en la regulación de apoptosis, la respuesta inmune, la inflamación, la angiogénesis y la coagulación [12, 18]. Algunos ejemplos de la asociación de MVs y el cáncer incluyen el reporte de Antonyak y colaboradores, en el que muestran que MVs derivadas de células cancerosas son capaces de conferir características malignas a células epiteliales [19]. Asimismo, estudios recientes demostraron la habilidad de las MVs de “preparar” o “acondicionar” los nichos metastáticos. Así, se ha visto que exosomas de células de melanoma son capaces de reprogramar células de la médula ósea hacia un fenotipo pro-angiogénico que promueve la formación de tumores y metástasis. En línea con estos resultados, el tratamiento de ratones con exosomas de melanoma tiene como efecto la formación temprana de metástasis [20].

Las funciones descritas para las MVs se basan en la interacción que estas tienen con las células receptoras y de los efectos que ejercen sobre estas. Luego de la interacción inicial, las MVs pueden mantenerse asociadas de forma estable en la superficie celular, fusionarse con la célula o ingresar mediante algún tipo de

endocitosis, permitiendo así la liberación al interior celular del contenido de las MVs. Es importante mencionar que la interacción de las MVs con sus células blanco sucede de forma específica, si bien las bases celulares y moleculares de este proceso no son del todo comprendidas. Se cree que la selectividad de interacción puede estar determinada por moléculas de adhesión, tales como integrinas, presentes en la superficie de las MVs.

Hasta el momento se han detallado aspectos generales de la biogénesis, mecanismo de acción y selección de la carga de las MVs, que se desprenden principalmente de lo reportado en células de mamífero. Si bien la información disponible para procariotas y eucariotas inferiores es en comparación mucho más limitada, la misma es suficiente para sustentar su relevancia, especialmente en el caso de microorganismos patógenos y su interacción con el hospedero.

1.2 MVs en microorganismos y organismos patógenos

En el contexto de un organismo multicelular, las MVs pueden entenderse como transportadores “multi-propósito” capaces no solo de establecer la comunicación entre células, sino también de permitir el intercambio de material genético y contribuir a la protección celular frente a factores tanto externos como internos [21]. En microorganismos, la producción de MVs ha sido reportada para bacterias, arqueobacterias, hongos y protozoarios. La liberación de estas vesículas permite a los microorganismos responder a señales ambientales, secretar componentes (entre ellos factores de virulencia), y en el caso de los patógenos, interactuar con la célula hospedera, como se esquematiza en la figura 3. Dado que el fenómeno se encuentra conservado en múltiples organismos, se considera que las funciones mediadas por MVs son cruciales para la vida microbiana [22].

La liberación de MVs por parte de eucariotas patógenos es un fenómeno actualmente reconocido como un evento biológico real, que tiene lugar a lo largo de todo el ciclo de vida de estos organismos, y que puede ser percibido por la célula hospedera, teniendo efectos sobre la misma [23-25]. Existen múltiples ejemplos de la interacción que tiene lugar entre las MVs producidas por organismos parásitos y sus hospederos. Recientemente ha sido reportado que los trematodos parásitos

Echinostoma caproni y *Fasciola hepatica* liberan MVs que son internalizadas por células del epitelio intestinal [26]. *Cryptococcus neoformans*, causante de la meningoencefalitis criptocócica, produce y libera MVs que contienen su principal factor de virulencia [27]. Estas MVs se han encontrado acumuladas en los sitios de infección y facilitan el pasaje de este hongo unicelular a través de la barrera hematoencefálica [28].

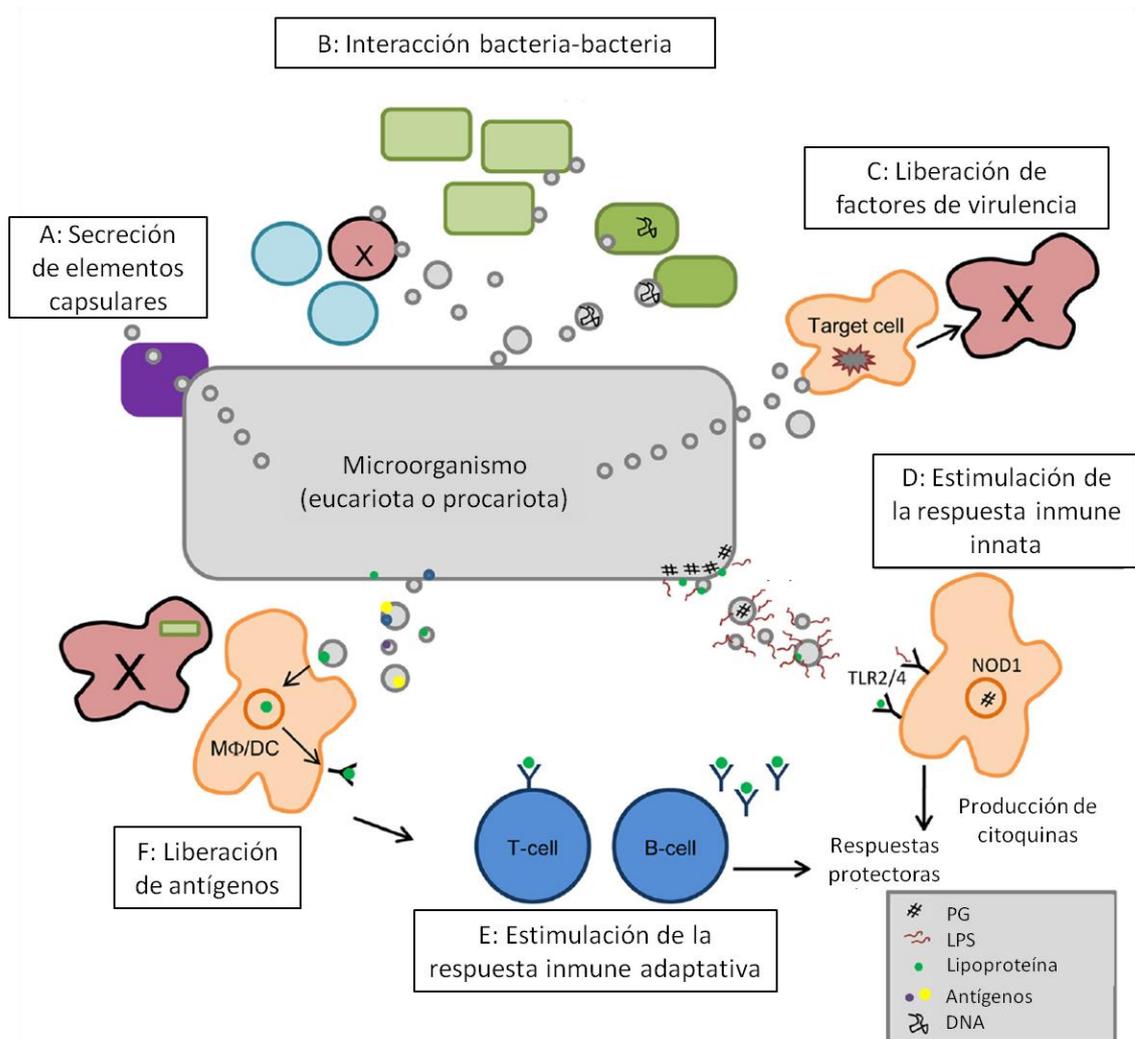


Figura 3. Esquema de los posibles efectos y roles de la liberación de MVs por microorganismos. A: En bacterias, las MVs pueden participar en la secreción de polisacáridos capsulares. B: las MVs también pueden ser utilizadas como medio de comunicación en *Bacteria* y *Archea*, a través del transporte de antimicrobianos, material genético y moléculas involucradas en procesos de *quorum sensing*. C: en microorganismos patógenos, las MVs pueden ser el vehículo de factores de virulencia. D: asimismo, pueden transportar moléculas tales como lipopolisacárido (LPS), lipoproteína o peptidoglicános (PG) que permitan la activación de la respuesta inmune innata. E: las MVs pueden dar lugar entonces a la activación de la respuesta inmune adaptativa, a través de la activación de la respuesta innata o gracias al transporte de moléculas antigénicas que serán recibidas por células presentadoras de antígenos (F). Modificado de [22].

En *Leishmania donovani* se ha visto que los exosomas producidos por este parásito contienen reconocidos factores de virulencia capaces de afectar vías regulatorias y de señalización en la célula hospedera. Los mismos son internalizados por macrófagos mediante vías dependientes de actina [25, 29]. Asimismo, estos exosomas han demostrado tener capacidad inmunomoduladora dado que el tratamiento de ratones con los mismos previo a la infección resultó en una mayor carga parasitaria y una mayor progresión de la enfermedad [30-31]. Más recientemente se ha descrito que los exosomas liberados por *L. donovani* causan una reducción en los niveles del microARN miR-122 en hepatocitos, y que la internalización de los mismos es necesaria para que esto ocurra. miR-122 tiene funciones regulatorias sobre el metabolismo del colesterol, reduciendo los niveles del mismo, y su disminución tiene efectos favorables para la infección [32].

En cuanto al organismo de estudio en este trabajo, *Trypanosoma cruzi*, la liberación de vesículas extracelulares y su implicancia en la infección han sido reportadas. Estos aspectos serán descritos en secciones posteriores, pero siguen la línea de los antecedentes presentados para otros organismos, los cuales destacan la importancia de las vesículas extracelulares como un factor relevante en la interacción parásito-célula hospedera.

1.3 *T. cruzi* como organismo de estudio

T. cruzi es el protozoo parásito causante de la tripanosomiasis americana o la enfermedad de Chagas. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que entre 7 y 8 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas por este parásito [33] y que un 30-40% tienen o desarrollarán cardiopatías crónicas, síndromes digestivos o ambos [34]. Tradicionalmente se consideraba que se trataba de una enfermedad endémica de países de América Latina, pero debido a los flujos migratorios, se ha convertido en un problema sanitario emergente en Europa y países como Estados Unidos y Canadá [34].

1.3.1 Ciclo de vida

T. cruzi tiene un ciclo de vida complejo durante el cual debe alternar entre un hospedero vertebrado y un hospedero invertebrado. Los vectores invertebrados que

transmiten el parásito son especies de la subfamilia Triatominae, especialmente *Triatoma infestans* (comúnmente llamada vinchuca) y *Rhodnius prolixus*. Los parásitos son depositados junto con las heces que deja el insecto mientras se alimenta. En este punto se encuentran en la forma de tripomastigotas metacíclicos, y pueden acceder al medio interno del hospedero vertebrado a través del sitio de la punción o a través de las mucosas. Por tratarse de un parásito intracelular, una vez dentro del organismo debe ingresar a las células, proceso que requiere del reclutamiento de lisosomas celulares a la membrana plasmática de la célula hospedera. Ya dentro de la célula hospedera, el parásito adopta la forma amastigota, y comienza a replicarse por fisión binaria, ocupando todo el espacio celular. Luego de varias rondas de replicación, los amastigotas se diferenciarán a tripomastigotas y abandonarán la célula huésped, pudiendo a continuación ingresar al torrente sanguíneo o infectar otras células perpetuando así el ciclo replicativo dentro del hospedero [35-36]. Aquellos tripomastigotas que hayan alcanzado la circulación sanguínea podrán ser eventualmente ingeridos por el vector hematófago, y una vez que alcancen el intestino medio de éstos se diferenciarán a la forma epimastigota. En este estadio se dividen por fisión binaria y no son capaces de infectar al hospedero vertebrado, aunque recientemente se ha descrito que tanto la forma amastigota como la epimastigota son infectivas, si bien existen diferencias en los tiempos de replicación, diferenciación y liberación [37]. Una vez que llegan al intestino posterior, detienen la división y se diferencian a la forma infectiva de tripomastigotas metacíclicos.

Un esquema del ciclo de vida de *T. cruzi* se presenta en la figura 4. Es posible apreciar que el mismo implica por un lado cambios a nivel de forma, que preparan al parásito para los distintos contextos con los que se encontrará a lo largo de su ciclo vital, y por otro la capacidad de alternar entre formas replicativas y no replicativas según se encuentre en un estadio infeccioso o de transmisión. No es sorprendente por tanto, que se pongan en marcha importantes mecanismos de regulación génica que permitan controlar finamente los cambios que sufre el parásito a lo largo de su ciclo de vida [38].

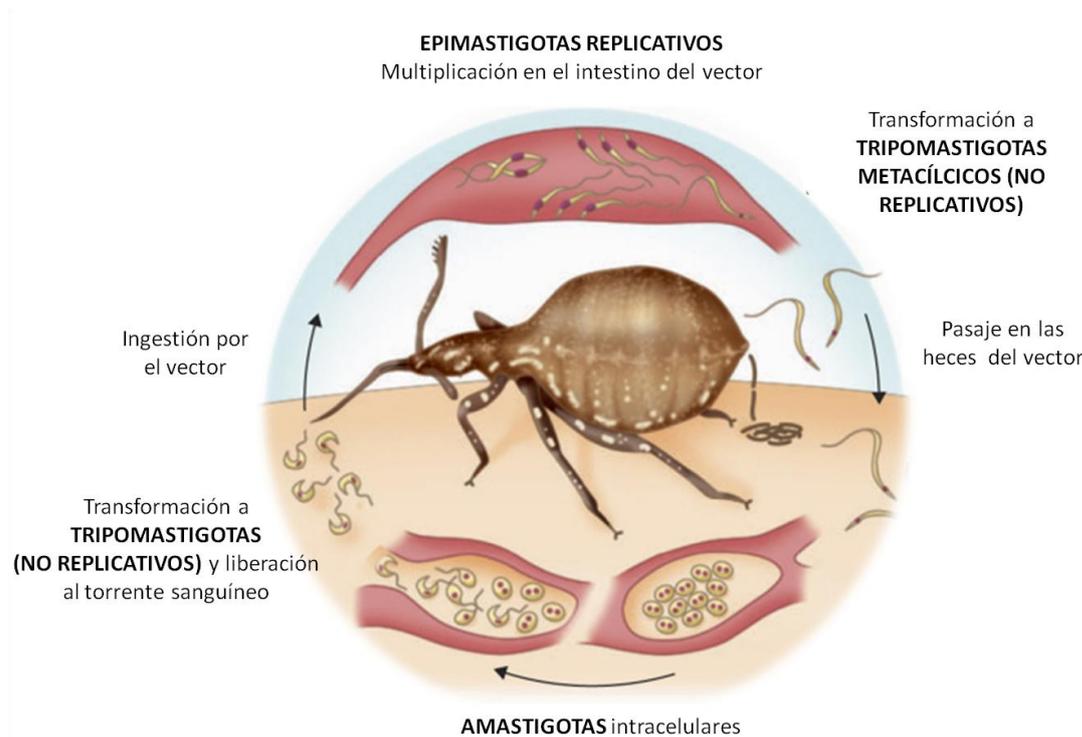


Figura 4. Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se muestra de forma simplificada el ciclo vital del protozoario parásito *T. cruzi*. En el mismo puede apreciarse la alternancia entre formas replicativas y no replicativas, así como estadios intra y extracelulares durante el pasaje por hospederos vertebrados e invertebrados. Tomado y modificado de [39].

1.3.2 Regulación de la expresión génica

Uno de los aspectos más interesantes de la biología de *T. cruzi* es el de la regulación de la expresión génica. Por un lado, en estos parásitos los genes codificantes de proteínas carecen en su amplia mayoría de intrones y se encuentran densamente empaquetados en clusters, separados por regiones intergénicas no muy extensas. Estos arreglos de genes constituyen una unidad de transcripción policistrónica [40-41]. La transcripción policistrónica implica que ciertos mecanismos deberán ponerse en marcha para asegurar que se obtengan transcritos maduros individuales (monocistrónicos), es decir poliadenilados en su extremo 3' y que posean el CAP o caperuza en el extremo 5'. La adición del CAP se logra por un mecanismo de trans-splicing, durante el cual los ARNs mensajeros individuales son clivados del precursor y se unen a través del extremo 5' a una molécula de ARN de aproximadamente 39 nt, que posee CAP [42]. Se cree que la adición de la cola poliA sucede de forma concertada a la adición del CAP [43-44]. Más interesante aun es el hecho de que genes que se encuentran en la misma unidad de transcripción son diferencialmente expresados. Todas estas evidencias indican que la mayor parte de la regulación de la expresión

génica debe darse a nivel post-transcripcional. De hecho, la síntesis de ARN mensajero parece ocurrir constitutivamente, de forma que los transcriptos se encuentren disponibles para ser traducidos a proteínas si fuese necesario. Se cree que la inversión energética en la producción continua de mensajeros es compensada por la capacidad de responder rápida y eficientemente a los cambios ambientales como puede ser el pasaje de un hospedero a otro [45].

De este modo, puntos importantes de regulación de la expresión génica incluyen la estabilidad y recambio de los mensajeros y por tanto su abundancia y disponibilidad [42, 46], así como la formación de cuerpos de procesamiento (cuerpos P o P bodies) y gránulos de estrés, en los que los ARNs mensajeros podrán ser degradados, almacenados o retornar al “pool” traduccionalmente activo [47].

Considerando la naturaleza post-transcripcional de los mecanismos que regulan la expresión mencionados hasta este punto, no resultaría sorprendente que *T. cruzi* presentase la capacidad de regular su expresión génica por vías que involucren pequeños ARNs. De hecho, estas vías así como la maquinaria proteica general que la lleva a cabo se encuentran distribuidas en todo el dominio eucariota, y se cree que estaban presentes en el último ancestro común de éstos [48]. Sin embargo, *T. cruzi* no es capaz de desencadenar silenciamiento génico a partir de ARN doble cadena, y la maquinaria canónica o clásica de silenciamiento por pequeños ARNs parece estar ausente o muy simplificada en este parásito [49]. No obstante, una serie de resultados recientes obtenidos por nuestro grupo de trabajo indican que es posible que existan vías alternativas o no canónicas de regulación de la expresión génica mediada por pequeños ARNs en este parásito. Por un lado, se identificó la existencia de una proteína, que se expresa en todos los estadios del ciclo de vida del parásito, con características a nivel de dominios que la identifican como una proteína del tipo Argonauta [50], la principal efectora de la vía de regulación por pequeños ARNs [51]. A su vez, se ha visto que co-localiza en gránulos de epimastigotas sometidos a stress nutricional con una nueva clase de pequeños ARN derivados de ARN de transferencia (ARNt) [52]. Los mismos han recibido creciente atención en los últimos años, y serán discutidos con mayor detalle en secciones posteriores.

1.3.1 MVs de *T. cruzi*

En *T. cruzi* la liberación de antígenos de superficie en forma de vesículas membranosas se reportó hace más de 20 años [53]. Recientemente se ha descrito que tanto los epimastigotas como los tripomastigotas metacíclicos utilizan al menos dos mecanismos diferentes para la biogénesis y liberación de MVs. De forma similar a lo que ocurre en eucariotas superiores, tiene lugar tanto la formación y liberación de vesículas de tamaños superiores a 100 nm a nivel de la membrana plasmática así como la exocitosis de vesículas de menor tamaño a partir de cuerpos multivesiculares, lo cual en estos parásitos ocurre a nivel del bolsillo flagelar [54]. Los autores de este reporte demuestran además, mediante análisis proteómicos, que existe una distribución diferencial de proteínas en las distintas poblaciones de MVs. Finalmente, presentan evidencias de que los parásitos liberan MVs mientras se encuentran en contacto con la célula hospedera así como cuando son internalizados en ésta. Asimismo proponen que la liberación de las MVs y su contenido tendrían un efecto en la célula hospedera que promueve la replicación y supervivencia del parásito.

Esta hipótesis se ve apoyada por evidencias anteriores, tales como el reporte por parte de Trocoli-Torrecilhas y colaboradores, quienes demostraron que el tratamiento de ratones con MVs previo a la infección producía en éstos muerte prematura, una intensa respuesta inflamatoria y favorecía el parasitismo cardíaco [55]. De la misma manera, se ha visto que *T. cruzi* invade 5 veces más aquellas células que han sido pre-tratadas con MVs que las que no han recibido tratamiento [56-57].

Resultados de nuestro grupo de trabajo han demostrado que epimastigotas de *T. cruzi* sometidos a stress nutricional liberan grandes cantidades de MVs al medio extracelular. A su vez, se describió la incorporación de estas MVs y su contenido no solo por otros parásitos sino por las células de mamífero hospederas. La incorporación de MVs por parte de otros parásitos estimula la transición del estadio epimastigota no infectivo al estadio tripomastigota infectivo. En cuanto a las células hospederas, se vio que las MVs se encuentran involucradas en la susceptibilidad a la infección de las mismas. Se demostró que el contenido de las MVs solo es transferido a células susceptibles a la infección, al tiempo que las no susceptibles, al ser artificialmente transformadas con el contenido de las mismas se vuelven susceptibles (Garcia-Silva et al 2013, aceptado).

Por otra parte, el secuenciado masivo del contenido de pequeños ARNs de las MVs reveló que las mismas contienen principalmente pequeños ARNs derivados de ARN ribosomal (ARNr) y de ARNt, pero también de pequeños ARNs nucleolares (snoARNs) y regiones intergénicas (Garcia-Silva et al 2013, aceptado). Los pequeños ARNs derivados de ARNt (tsRNAs) fueron reportados por nuestro grupo como la principal población de pequeños ARNs en este parásito que, como fue mencionado anteriormente, carece de las vías canónicas de regulación de la expresión mediada por pequeños ARNs [52]. Asimismo, se observó que los tsRNAs provenían en su mayoría de ciertos ARNt en particular, tales como los ARNt de Leucina, Treonina y Glutámico, los cuales en conjunto dan cuenta de ~80% de los tsRNAs presentes en las MVs. Es interesante destacar que los tsRNAs más representados en las MVs no son los más abundantes dentro del parásito (a excepción del tsRNA derivado del ARNt de Glutámico), lo cual indicaría que son incluidos en éstas de forma específica, y que por lo tanto podrían cumplir una función en la célula de destino, ya sea esta una célula hospedera u otro parásito. La presencia de pequeños ARNs derivados de ARNr, ARNt y snoRNA en vesículas de patógenos ha sido también reportada en exosomas de *L. donovani*, si bien su rol es aún desconocido [58].

En conjunto, los antecedentes presentados sugieren fuertemente que las MVs tienen un rol relevante en el proceso de infección y que podrían estar “preparando” a la célula hospedera para la invasión del parásito o generando un ambiente propicio para su sobrevivencia. Se desconoce aún cuales son los mecanismos por los cuales tendría lugar este fenómeno y cuál es el rol de los distintos componentes de éstas.

1.4 Pequeños ARNs derivados de ARN de transferencia (tsRNAs)

El rol de los pequeños ARNs no codificantes (sARNs) como reguladores de la expresión génica es actualmente ampliamente reconocido. Se cree que hasta un 30% de los genes humanos ven regulada su expresión, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, por vías que involucran pequeños ARNs no codificantes que tienen la capacidad de inducir el silenciamiento génico a través del apareamiento secuencia-específico con los ARN blancos. Varias clases de sARNs han sido identificadas, entre las que destacan los microARNs (miARNs), los pequeños ARNs

interferentes (siARNs) y los pequeños ARNs asociados a proteínas Piwi (piARNs) [51, 59].

Gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva aplicadas al estudio del transcriptoma humano, la familia de pequeños sARNs se ha visto ampliada. Estas nuevas clases de sRNAs son generadas a partir de otras moléculas de ARN no codificante, caracterizadas con otras funciones tales como ARNr, ARNt, ARNs pequeños nucleares (snARNs), snoARNs y vault ARNs [60]. Entre estos, los tsRNAs han despertado especial interés debido a las evidencias que indican que participan en la regulación génica y a que se han encontrado en un amplio rango de organismos tanto procariotas como eucariotas, siendo una de las clases de sARNs más conservados en la evolución [61-62].

1.4.1 Clasificación y biogénesis

Análisis de secuenciado masivo, especialmente en células humanas han resultado en la descripción de tsRNAs de distintos tamaños [63-65]. En base a esto y a otras características, los tsRNAs han sido clasificados en 2 grupos: las mitades de ARNt o tRNA halves, generados luego del clivado del ARNt en el anticodon, con un tamaño de entre 30 y 35 nucleótidos, y los fragmentos de ARNt o tRFs, con un tamaño de ~22 nucleótidos, originados principalmente mediante clivaje por ribonucleasas tipo Dicer. A continuación se detallan las características de cada uno de estos grupos. En la figura 5 puede verse un esquema de los distintos tipos de tsRNAs y los mecanismos de generación propuestos.

1.4.1.1 Mitades de ARNt (tRNA halves)

La generación de mitades de ARNt, también llamados por algunos autores fragmentos derivados de ARNt inducidos por estrés (sitARNs), ha sido descrita en miembros de toda la escala evolutiva, y su función como reguladores de la expresión génica ha sido reportada por varios grupos [63-64, 66-76]. El clivado de los ARNt en el anticodón es una respuesta conservada a ciertos tipos de estrés, tales como el oxidativo o el nutricional, pero no a la radiación y o UV en células humanas y levaduras [77]. La Angiogenina es la enzima encargada de producir el clivaje en eucariotas superiores [78-79], mientras que en levaduras quien lo hace es Rny1 [74].

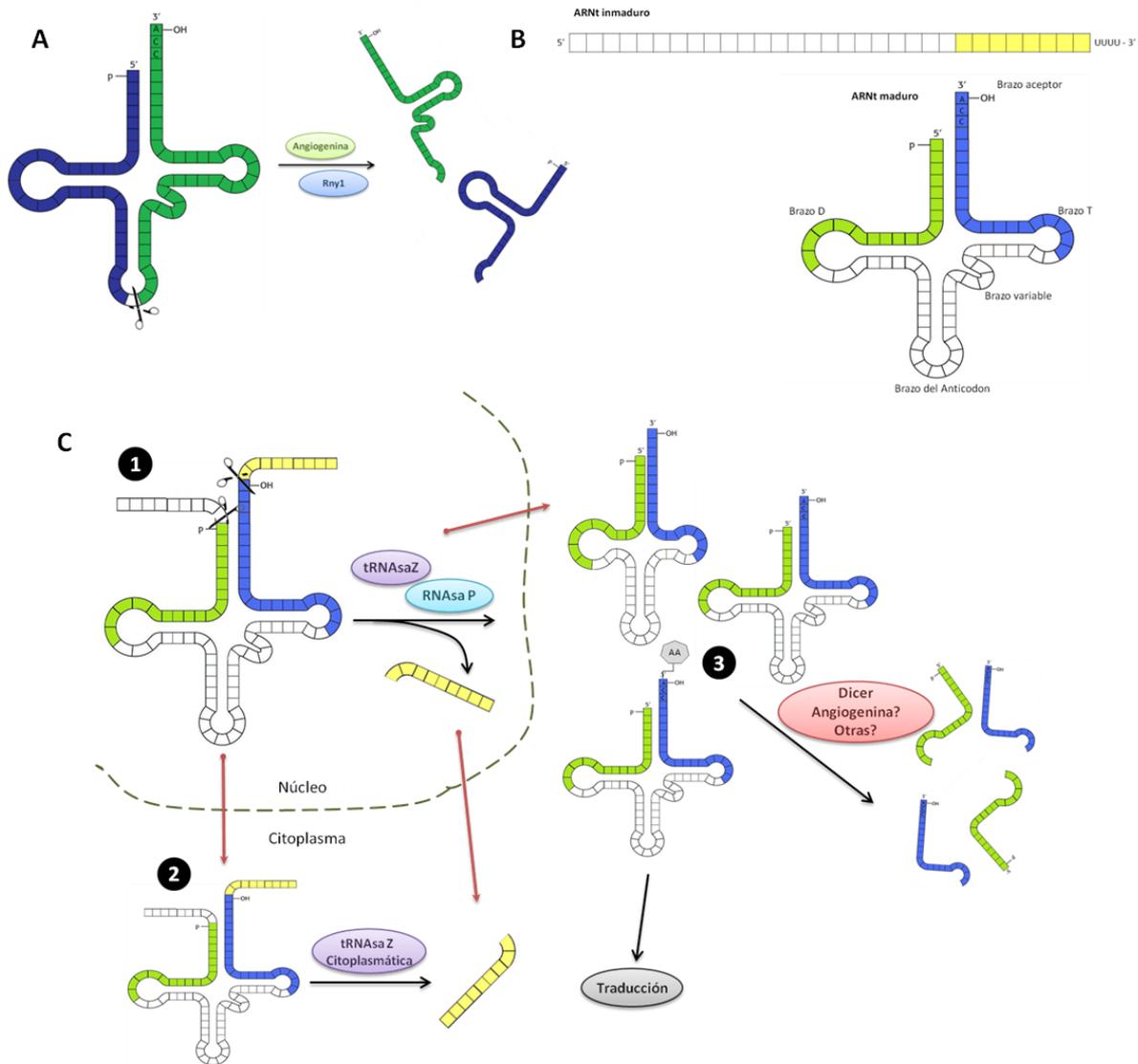


Figura 5. Representación de la fuente y mecanismo de biogénesis de las mitades de ARNt y fragmentos de ARNt. **A:** se muestra la generación de las mitades de ARNt a partir de moléculas de ARNt maduras gracias a la acción de enzimas que las clivan a nivel del anticodon (Angiogenina o Rny1). Las mitades derivadas del sector 3' o 5' se muestran en azul o verde respectivamente. **B:** esquema del origen de los fragmentos de ARNt (tRFs) y su clasificación en tres grupos. En amarillo se muestran los 3' U tRFs, en azul claro los 3' CCA tRFs y en verde claro los 5' tRFs. **C:** se presenta de forma simplificada las vías de biogénesis de los tRFs. Los 3' U tRFs podrían ser generados en el núcleo por la acción de la tRNAsaZ durante la maduración de los ARNt (1), y luego exportados al citoplasma. Otra posibilidad es que ARNt inmaduros sean exportados prematuramente al citoplasma, donde una fracción citosólica de la tRNAsaZ pueda cortarlos (2). Finalmente, los 3' CCA y los 5' tRFs podrían ser producidos en cualquier punto luego del procesamiento del ARNt (por la tRNAsaZ y la RNAsaP), a partir de ARNt plegados incorrectamente, plegados correctamente pero no aminoacilados o cargados con su aminoácido correspondiente (3) a través de la acción de Dicer u otras proteínas tales como la Angiogenina. Tomado y modificado de [80]

Se considera que las mitades de ARNt provienen principalmente de transcritos de ARNt ya procesados, dado que las mitades identificadas no tienen intrones pero sí extremos 3' y 5' maduros, e incluso algunos presentan la secuencia CCA en el extremo 3', característica de los ARNt. Sin embargo, a pesar de que los ARNt maduros parecen ser la fuente de las mitades de ARNt, no se registra una disminución en los niveles de los primeros luego de la biogénesis de los últimos, lo cual indica que solo una pequeña fracción del pool de ARNt maduros se ve involucrada en el proceso [81]. La producción de mitades de ARNt no está restringida a ARNt específicos, lo cual no implica que se trate de un proceso azaroso no regulado que afecta a cualquier molécula de ARNt indistintamente. De hecho, se ha visto en *Drosophila* que al menos algunos ARNt pueden ser protegidos del clivaje gracias a la metilación por Dnmt2 [73].

En los distintos organismos en los que han sido descritos, las mitades de ARNt se han visto asociadas a procesos como la proliferación o el desarrollo. En *Tetrahymena thermophila* se generan frente a la falta de ciertos aminoácidos con posibles efectos sobre la regulación del ciclo celular [70]. En *Aspergillus fumigatus* su generación tiene lugar durante la conidiogénesis [69], mientras que en *Streptomyces coelicolor*, su producción está relacionada a cambios morfológicos [67]. Finalmente, en *Giardia lamblia*, se han visto asociados a la transición entre el estadio de trofozoíto y el de quiste [71].

En cuanto al mecanismo por el cual actúan como reguladores de la expresión génica, Emara y colaboradores reportaron que la mitad 5' de ARNt de Alanina (principalmente), generada por el corte con Angiogenina, es capaz de inhibir el inicio de la traducción, de forma independiente del factor de iniciación 2α , y de inducir la formación de gránulos de estrés bajo ciertas condiciones en células de mamífero [82]. Posteriormente se describió que la habilidad de inhibir la traducción se correlacionaba con la capacidad de la mitad del ARNt de desplazar el factor eIF4G/A del ARN mensajero [83]. Por otra parte, se ha visto que la enzima tRNAsaZ, involucrada en el procesamiento y maduración del ARNt en células de mamífero, es capaz de degradar y por lo tanto silenciar la expresión de ARNs mensajeros utilizando un pequeño ARN guía complementario [84]. Se ha visto que la mitad 5' del ARNt de Glutámico puede ser utilizada como ARN guía y dirigir a la tRNAsaZ para la degradación de ARNs mensajeros con secuencias complementarias al tsRNA [85].

1.4.1.2 Fragmentos de ARNt (tRFs)

Como se mencionó anteriormente, los tRFs son fragmentos de ARNt de un tamaño menor al de las mitades de ARNt, y han recibido especial atención debido a sus similitudes con otros sRNAs, particularmente los miRNAs [68]. De acuerdo a la región del ARNt del que provienen, se los ha clasificado en 3 grupos. Un grupo incluye aquellos tRFs derivados del extremo 5' de ARNt maduros o inmaduros, y se les ha llamado 5'tRFs. Otro se compone de los fragmentos generados a partir del extremo 3' de ARNt maduros, y presentan la secuencia CCA, por lo que se los ha denominado 3'CCA tRFs. El último grupo comprende a los tRFs derivados del extremo 3' de ARNt inmaduros o pre-ARNt (también llamados "trailers 3'"), que característicamente presentan repetidos de uridinas en el extremo 3', y por ende reciben el nombre de 3' U tRFs [62].

En cuanto al rol de los tRFs en células de mamífero, dos grupos de forma independiente estudiaron el rol de un tRF (tRF 1001), perteneciente al grupo de los 3' U tRFs. Por un lado, Lee y colaboradores reportaron que este tRF tendría efectos sobre la proliferación celular [65], mientras que de forma independiente, se determinó que este tRF se encontraba asociado a proteínas Argonauta, y presentaba actividad de silenciamiento, de forma similar a los miARNs [68].

En relación a su biogénesis, la maquinaria involucrada en la generación de estos fragmentos es en cierta medida compartida con la encargada de la maduración de los ARNt. En particular, en el caso de los 3' U tRFs, estos son generados por la acción de la tRNAsaZ, encargada de la remoción del trailer 3', uno de los pasos de la maduración de los ARNt, que tiene lugar en el núcleo. Sin embargo, la mayor parte de los tRFs se encuentran casi exclusivamente en el citoplasma, lo cual implica que luego de ser generados deberán ser exportados fuera del núcleo. Alternativamente, una fracción citoplasmática de la tRNAsaZ podría generar los 3' U tRFs a partir de ARNt inmaduros que abandonaron el núcleo prematuramente [68, 85-86]. En el caso de los 5' tRFs y los 3' CCA tRFs, en células de mamíferos, su producción parece ser dependiente de la enzima Dicer [63, 68], una endonucleasa con un rol fundamental en la biogénesis de otros pequeños ARNs tales como los miARNs. La misma escinde sustratos de ARN doble cadena, dando lugar a fragmentos de ARN de un tamaño definido, generalmente entre 21 y 25 nucleótidos [51]. La acción de Dicer tiene lugar en el citoplasma por lo

que para la generación de los tRFs, los ARNt deber ser exportados desde el núcleo, lo cual puede suceder en distintos puntos de su maduración, dependiendo asimismo del tipo de tRF del que se trate. A pesar de los reportes que indican que la generación de estas clases de tRFs depende de Dicer, en un trabajo reciente por Li y colaboradores donde se analizan por secuenciado masivo células normales y deficientes en Dicer, se propone que la generación de los tRFs como familia en términos generales es independiente de Dicer, la cual solo afectaría a ciertos ARNt en particular, y que la Angiogenina sería capaz de generar fragmentos cortos de ARNt además de las mitades de ARNt [82, 87].

Independientemente de las posibles discrepancias en cuanto a la maquinaria encargada de generación de los tRFs, existe acuerdo de que no se trata de productos de degradación. El análisis detallado de datos de secuenciación masivo muestra claramente que los tRFs son generados siguiendo un patrón de clivado específico, ya sea desde el extremo 3' o 5', encontrándose casi completamente ausentes secuencias que incluyan la región del anticodón [63, 65, 68]. Ha sido sugerido además que, de forma similar a lo que sucede en la vía de generación de los miARNs, la acumulación de fragmentos derivados de un extremo mas no de otro puede deberse a la retención preferencial en la célula de uno de ellos [87]. Esta, junto con otras características mencionadas anteriormente (tales como su tamaño o su posible generación vía Dicer), los hace muy similares a los miARNs o los siARNs. Adicionalmente, muchos tRFs han sido encontrados en asociación con proteínas Argonauta [68, 88], las cuales, como ya fue mencionado, son fundamentales en la vía de silenciamiento por pequeños ARNs. Es posible que esta asociación implique que los tRFs compitan con otros pequeños ARNs que clásicamente se unen a estas proteínas. De esta forma, podrían actuar por un lado interfiriendo con la vía de silenciamiento mediada por miARNs o siARNs, o redirigiendo esta maquinaria a un grupo diferente de blancos en respuesta a determinados estímulos o bajo ciertas condiciones de estrés.

En conjunto, los antecedentes presentados a lo largo de la introducción muestran que la generación y liberación de MVs es un fenómeno que ocurre de forma casi universal a lo largo de la escala evolutiva. En el caso de eucariotas inferiores patógenos, como lo es *T. cruzi*, existen evidencias que apoyan la idea de que éstas tienen un rol en la infección, favoreciéndola, y un efecto sobre las células hospederas. Es interesante asimismo la inclusión en las MVs de algunos miembros de la principal clase de pequeños ARNs presentes en este parásito (tsRNAs), que no presenta las vías clásicas de regulación de la expresión génica mediada por pequeños ARNs, a pesar de que la mayor parte de la regulación en éste ocurre de forma post-transcripcional. Estos tsRNAs han sido descritos en una amplia variedad de organismos, tienen funciones regulatorias de la expresión génica por mecanismos no completamente dilucidados y podrían representar una vía ancestral de regulación de la expresión. Es en este contexto que se plantean los objetivos de este trabajo, en el cual se buscó contribuir al entendimiento de cada uno de los aspectos mencionados desde distintos abordajes.

2. Objetivos

Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la interacción mediada por MVs entre el protozoo parásito *T. cruzi* y la célula hospedera, a nivel celular y molecular. Considerando los antecedentes planteados, la hipótesis de trabajo es que las MVs inducirán cambios epigenéticos en la célula hospedera que favorecerán la infección por parte del parásito.

Objetivos específicos:

1. Identificar las vías de entrada a la célula de las MVs secretadas por el parásito.
2. Evaluar los cambios en la expresión génica de las células hospederas inducidos por la incubación con MVs empleando microarreglos de ADN copia.
3. Estudiar el posible rol de los tsRNAs transportados en las MVs de *T. cruzi* de modular la expresión génica en la célula hospedera.

3. Materiales y Métodos

3.1 Cultivo de epimastigotas de *T. cruzi*

Epimastigotas de *T. cruzi*, de la cepa Dm28c fueron mantenidos en fase de crecimiento exponencial en cultivo axénico, en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF) a 28°C, con pasajes cada 4 días.

3.2 Cultivo de línea celular HeLa

Células humanas derivadas de cáncer de cuello uterino de la línea HeLa fueron mantenidas en estufa a 37°C y 5% de CO₂ en medio RPMI suplementado con 10 % de SBF y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 mg/ml), con pasajes al alcanzar ~80% de confluencia.

3.3 Obtención y purificación de microvesículas de *T. cruzi*

Siguiendo procedimientos puestos a punto en el grupo de trabajo se inocularon 1×10^8 epimastigotas de *T. cruzi* en fase de crecimiento exponencial en 100 mL de medio LIT suplementado con 10% de SBF. Se mantuvieron a 28°C durante 5 días. El 5° día de cultivo el medio LIT-10% SBF es sustituido por medio de cultivo RPMI sin SBF. Los parásitos fueron mantenidos en este medio a 28°C durante 48 horas. Posteriormente el sobrenadante fue colectado y a partir del mismo se realizó la purificación de MVs, siguiendo el protocolo de Théry et al (2006) con algunas modificaciones. Brevemente, el sobrenadante libre de parásitos se centrifugó a 15000 g durante 45 minutos a 4°C, descartándose el pellet. El sobrenadante fue entonces centrifugado a 100000 g durante 70 minutos a 4°C. El pellet conteniendo las MVs fue lavado 1 vez con PBS 1X. El pellet final se resuspendió en 300 µL de PBS, HBS o medio RPMI dependiendo de su utilización posterior. La concentración de proteínas en la preparación de MVs (como estimador de la cantidad de MVs) fue determinada mediante el ensayo de Bradford en microplaca. Para los ensayos de interacción con las células hospederas, el protocolo de purificación de MVs fue realizado en condiciones de esterilidad.

3.4 Electroporación de MVs de *T. cruzi*

Aproximadamente 15 μg de MVs resuspendidas en buffer HBS (*Hepes Buffered Saline*, ver Anexo) fueron incubadas durante 10 minutos en hielo con una sonda de ADN marcada con Cy3 o con FAM (Ver Anexo) en una concentración final de 50 μM en cubetas de electroporación de 4 mm. Posteriormente fueron sometidas a un pulso de 450 V, 1300 μF y 13 Ω en el sistema ECM 600[®] de BTX. Para permitir la recuperación de las MVs electroporadas, las mismas fueron incubadas a 37°C durante 2 horas o a 4°C overnight. Nos referiremos a aquellas MVs que incorporaron la sonda marcada con Cy3 (cyanine 3) como MVs-Cy3 y a aquellas marcadas con FAM (carboxifluoresceína) como MVs-FAM (Ver figura 6). Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en condiciones de esterilidad.

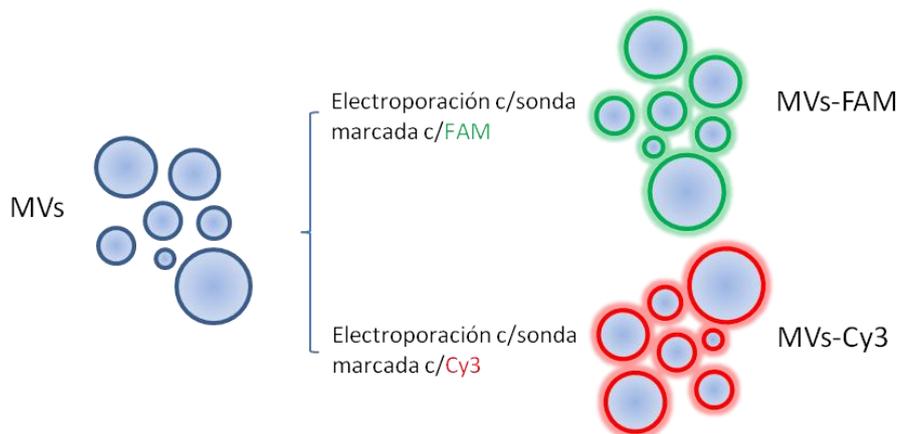


Figura 6. Esquema representativo del marcado de las MVs. Las MVs purificadas fueron electroporadas con una sonda marcada con carboxifluoresceína (MVs-FAM) o Cyanine3 (MVs-Cy3).

3.5 Puesta a punto de las condiciones de incubación de células hospederas con MVs de *T. cruzi*

Con el fin de poner a punto de las condiciones de incubación se hicieron crecer células HeLa sobre cubreobjetos en placas de 6 pocillos en las condiciones antes descritas.

3.5.1 Determinación del tiempo de incubación

Para la determinación del tiempo de incubación, las mismas fueron tratadas durante 30 minutos, 2 horas y 24 horas con MVs-Cy3. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo fue removido, las células tratadas con MVs-Cy3 fueron

lavadas con PBS, teñidas con DAPI y analizadas por microscopía de epifluorescencia (Ver figura 7).

3.5.2 Determinación de la relación MVs/célula

Para la determinación de la relación MVs/células a emplear durante la incubación, el mismo número de células HeLa (0.5×10^6) fueron sembradas y crecidas sobre cubreobjetos y posteriormente incubadas con cantidades crecientes de MVs no marcadas durante 2 horas en estufa a 37°C y 5% CO_2 . Posteriormente las células fueron sometidas a FISH, para la detección de pequeños ARNs presentes en las MVs de *T. cruzi*. Para ello fueron lavadas con PBS, fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS, lavadas con PBS e incubadas con NH_4Cl 25 mM, nuevamente lavadas con PBS y permeabilizadas empleando PBS-Tritón 0,2%. Luego de lavados consecutivos con SSC 2X y SSC 2X-formamida 50%, los cubreobjetos fueron bloqueados y prehibridados en buffer de hibridación durante 1 hora a temperatura ambiente. La hibridación se realizó overnight, a 37°C , en cámara húmeda, empleando una concentración final de la sonda de 100 nM. Luego de la hibridación los cubreobjetos fueron lavados dos veces con SSC 2X-formamida 50%, dos veces con SSC 2X, 1 vez con SSC 1X, incubados con DAPI (1mg/mL) y finalmente lavados con SSC 0,5X y SSC 0,1X. Para amplificar la señal proveniente de la sonda, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-Cy3 (Invitrogen), utilizando el anticuerpo anti-mouse-TRITC (Invitrogen) como anticuerpo secundario. Por último, las células analizadas por microscopía de epifluorescencia. (Ver figura 7).

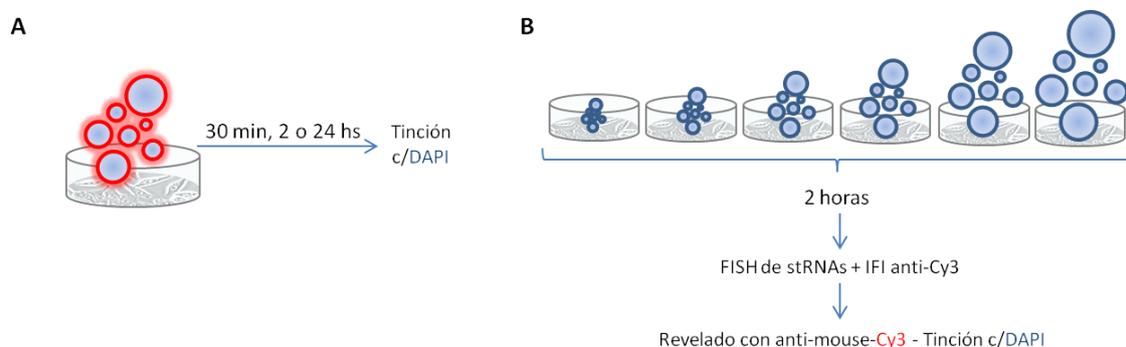


Figura 7. Representación de los ensayos realizados para la puesta a punto de las condiciones de incubación de las MVs con las células hospederas. A: Determinación del tiempo de incubación con MVs, en el que se incuban MVs-Cy3 durante distintos tiempos con células HeLa. **B:** Determinación de la relación MVs/células. Se tratan células con cantidades crecientes de MVs no marcadas, y la presencia de estas se determina luego de 2 horas mediante FISH e inmunofluorescencia (IFI) anti-Cy3.

3.6 Ensayos de viabilidad

Las células tratadas con MVs fueron sometidas a ensayos de viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta a las 24, 48 y 72 horas luego de la incubación con MVs en las condiciones definidas durante la puesta a punto. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, con 7 réplicas para cada condición. Las células control fueron tratadas con HBS, ya que éste es el buffer en que se encontraban las MVs. Por otra parte, células transfectadas en las condiciones descritas en el ítem 3.8 fueron sometidas al mismo ensayo, 24h horas post-trasfección. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, con 8 réplicas para cada condición. Como control se incluyeron células sin tratar y células tratadas únicamente con el agente de transfección.

En ambos casos, luego del tratamiento y transcurrido el tiempo correspondiente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con PFA 4%. Posteriormente fueron incubadas durante 10 minutos en una solución de cristal violeta 0,05% en etanol 20%. Luego los pocillos fueron lavados con agua del grifo, secados con papel absorbente, e incubados durante 15 minutos con etanol 95%. Finalmente se midió la densidad óptica a 595 nm en el lector de placas Multiskan Ex (Thermo Scientific). Para determinar la existencia de diferencias significativas se aplicó un test de t o un ANOVA, dependiendo del ensayo.

3.7 Análisis de las vías de entrada de las MVs a la célula hospedera

Para la identificación de las posibles vías de entrada a la célula hospedera se emplearon marcadores de ciertos compartimentos celulares, candidatos de acuerdo a la literatura. Células HeLa fueron tratadas durante 5 o 30 minutos con MVs-FAM, y durante 30 minutos, 2 horas o 24 horas con MVs-Cy3. Todas las incubaciones se realizaron en estufa a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio de cultivo de las células tratadas con las MVs-FAM fue removido y las mismas fueron incubadas con el marcador de membranas celulares CellMask Orange (Invitrogen). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% para finalmente ser sometidas a tinción con DAPI (Invitrogen). Por otra parte, las células tratadas con MVs-Cy3 fueron lavadas con PBS, fijadas con PFA al 4% y permeabilizadas empleando PBS-Tritón 0,2%. Posteriormente las mismas fueron incubadas con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-EEA1 (endosomas

tempranos; 30 minutos y 2 horas), anti-Rab7 (endosomas tardíos; 30 minutos y 2 horas), anti-LAMP (lisosomas; 2 y 24 horas). El anticuerpo anti-Rabbit Alexa 488 (Invitrogen) fue empleado como anticuerpo secundario en todos los casos. Por último, las células fueron teñidas con DAPI y analizadas por microscopía de epifluorescencia (Ver figura 8).

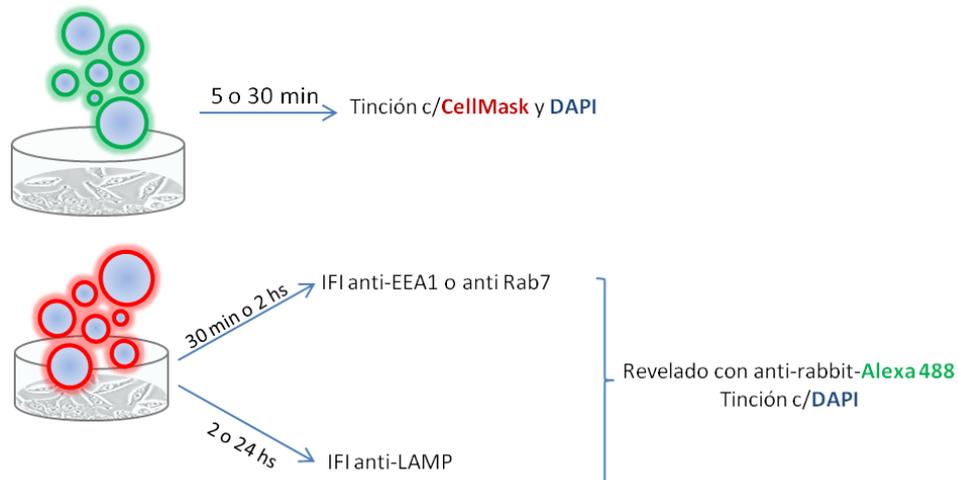


Figura 8. Diagrama de los ensayos llevados a cabo para la identificación de las vías de entrada de las MVs a la célula hospedera. Por un lado se utilizan MVs-FAM en conjunto con el marcador de membranas celulares CellMask, y por otro se emplean MVs-Cy3 en combinación con distintos marcadores celulares (EEA1, Rab7, LAMP). Se realizan asimismo incubaciones de distinta duración.

3.8 Transfección de células HeLa con pequeños ARNs sintéticos

Células de la línea HeLa fueron transfectadas con oligoribonucleótidos sintéticos (Integrated DNA Technologies), con ciertas modificaciones químicas que les confieren mayor resistencia a nucleasas celulares (agregado de 2-O-metilo en algunas bases y esqueleto de fosforotioato). Los mismos tienen unido un marcador fluorescente (Cy3 o FAM) para poder verificar la entrada de los oligonucleótidos a las células. Las características de las distintas sondas de ARN se presentan en la Tabla S1 (Ver Anexo). Las sondas sintéticas corresponden a los pequeños ARNs identificados mediante secuenciado masivo como los más abundantes dentro de las MVs secretadas por *T. cruzi* (Garcia-Silva et al 2013, aceptado). Asimismo se diseñaron sondas con la misma composición de bases pero distinta secuencia (indicadas como “Scr” o Scrambled), como control de especificidad. Se utilizó Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como agente de transfección (2 μ L/mL) y se utilizó 1 pmol de sonda a una concentración final de 20 nM.

3.9 Ensayos de microarreglos

3.9.1 Obtención de las muestras

3.9.1.1 Células tratadas con MVs

Para la obtención del ARN necesario para realizar los ensayos de microarreglos, la misma cantidad de células HeLa fue sembrada en botellas de cultivo de 25 cm² y mantenida en las condiciones antes detalladas. Posteriormente las mismas fueron incubadas con la preparación de MVs (no electroporadas) durante 2 horas en estufa a 37°C y 5% CO₂. Luego de transcurridas las 2 horas de interacción, el medio conteniendo MVs fue removido, las células se lavaron con PBS y se adicionó medio de cultivo fresco. La colecta de las células para la extracción de ARN se realizó a las 6, 24 o 72 horas post-interacción. Las células control recibieron el mismo tratamiento, siendo incubadas con medio de cultivo sin agregado de MVs. Cada condición se realizó por triplicado.

3.9.1.2 Células transfectadas con tsRNAs

El mismo número de células HeLa fue sembrado en botellas de cultivo de 25 cm² y mantenida en las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente las mismas fueron transfectadas con cada una de las sondas de ARN descritas anteriormente por separado, a una concentración de 20 nM. 24 horas post-transfección las células fueron colectadas para la extracción de ARN. Como control se incluyeron células tratadas únicamente con el agente de transfección. Las células transfectadas con las sondas Leu^{CAG} y Thr^{AGT} se incluyeron por triplicado, mientras que las transfectadas con Leu^{CAG}Scr, Thr^{AGT}Scr y las células control se realizaron por duplicado.

3.9.2 Purificación y procesamiento del ARN

Para la extracción de ARN se empleó un protocolo mixto. Las células (tratadas y control) fueron colectadas y lisadas con TRIzol (Invitrogen). Posteriormente se adicionaron 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol utilizado, se aplicó vortex, se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó la muestra por 15 minutos a 12000g a 4°C. La fase acuosa obtenida fue entonces procesada empleando el kit Illustra RNAspin Mini Isolation kit (GE Healthcare), en el caso de las muestras de células tratadas con MVs, y con el kit RNAeasy mini kit (QIAGEN) para las muestras de células transfectadas, siguiendo las recomendaciones del fabricante correspondiente.

La integridad y calidad del ARN obtenido fue evaluada utilizando el kit RNA 6000 Nano LabChip en el equipo 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies).

La amplificación y el marcado del ARN fueron llevados a cabo empleando el kit Quick Amp Labeling Kit-one color (Agilent Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras fueron marcadas con Cy3. El ARN marcado y amplificado fue purificado mediante el kit RNeasy mini kit (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cuantificación del ARN y la determinación del ARN marcado fueron realizadas utilizando la herramienta Microarray Measurement del equipo NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

3.9.3 Hibridación, lavado y escaneo de los microarreglos

La etapa de hibridación de los chips de microarreglos se realizó empleando el kit Gene Expression Hybridization kit (Agilent Technologies), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El diseño de los chips se muestra en la figura 9.

Las etapas de lavado se realizaron utilizando el kit Gene Expression Wash Buffer kit (Agilent Technologies) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La lectura de los chips, así como los primeros controles de calidad se realizaron en el High-Resolution C scanner (Agilent Technologies).

3.9.4 Análisis de los resultados

Los resultados de la lectura de los chips fueron analizados empleando el software GeneSpring Multi-Omics Analysis, versión 12.1 (Agilent Technologies). Los valores de intensidad de fluorescencia fueron transformados a escala logarítmica, normalizados mediante normalización por cuantil y mediante ANOVA se identificaron aquellos genes que se encontraban diferencialmente expresados con respecto al control que presentaran un p-valor ≤ 0.05 (la computación del p-valor se realizó de forma permutativa, con 100 iteraciones, empleando la corrección de Benjamini-Hochberg). Las listas de genes diferencialmente expresados fueron analizadas empleando las herramientas del software antes mencionado, así como también a través de la plataforma DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, [89-90]), disponible en línea.

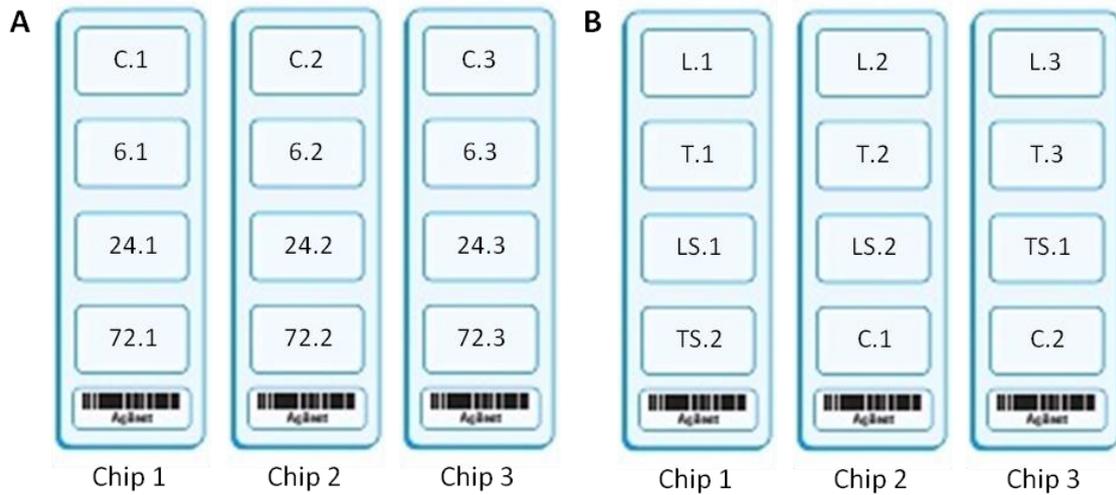


Figura 9. Diseño de los chips de microarreglos del tipo 4x44k (Agilent Technologies.: A. Distribución de las muestras tratadas con MVs. C.1, C.2, C.3: muestras control (sin tratamiento con MVs); 6.1, 6.2, 6.3: muestras del tiempo uno (6 horas post-tratamiento con MVs); 24.1, 24.2, 24.3: muestras del tiempo dos (24 horas post-tratamiento con MVs); 72.1, 72.2, 72.3: muestras del tiempo tres (72 horas post-tratamiento con MVs). B. Distribución de las muestras transfectadas con tsRNAs. L.1, L.2, L.3: muestras transfectadas con la sonda Leu^{CAG}; T.1, T.2, T.3: muestras transfectadas con la sonda Thr^{AGT}; LS.1, LS.2: muestras transfectadas con la sonda Leu^{CAG}Scr; TS.1, TS.2: muestras transfectadas con la sonda Thr^{AGT}Scr; C.1, C.2: muestras tratadas con el agente de transfección (Lipofectamine 2000).

3.10 PCR en tiempo real (qPCR)

Para la validación de los resultados obtenidos en los ensayos de microarreglos se analizaron las muestras de ARN mediante PCR en tiempo real (qPCR). Para ello, 1 µg de ARN de cada una de las muestras (por triplicado) fue sometido a retrotranscripción, empleando la retrotranscriptasa Super Script II (Invitrogen) y un oligo poli-dT como cebador para poder generar ADN copia (ADNc) de los ARNs mensajeros presentes en cada muestra, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Asimismo, se diseñaron cebadores para la amplificación específica de los siguientes genes humanos: ATF3, DUSP6, CAXCL2 y GAPDH (utilizado para la normalización). La secuencia de los cebadores diseñados, así como sus características se detallan en la Tabla S2 (ver Anexo). Previo a la realización de los ensayos de qPCR los cebadores diseñados fueron testeados en reacciones de PCR a tiempo final para la puesta a punto de las condiciones de ciclado y para verificar que dieran lugar a un único producto de PCR del tamaño esperado. Se aplicó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [91] para el análisis de los datos.

4. Resultados y Discusión

El presente trabajo tenía por principal objetivo estudiar la interacción entre el protozoo parásito *T. cruzi* y las células de mamífero hospedadas, que tiene lugar no de forma directa, sino a través de microvesículas que el parásito libera al medio extracelular.

Esta interacción fue abordada a distintos niveles. Por un lado, se buscó identificar la vía de ingreso de las MVs a la célula, empleando microscopía de fluorescencia. Posteriormente, se evaluó la respuesta celular al tratamiento con MVs a nivel del transcriptoma mediante microarreglos de ADN copia. Finalmente se analizó el efecto sobre las células hospedadas de dos pequeños ARNs derivados de ARNt, representativos de la fracción de pequeños ARNs que transportan las MVs, también a nivel de los mensajeros de ARN.

Los resultados de este trabajo se presentan en cinco secciones. En la primera se describen los ensayos realizados para la determinación de las condiciones del tratamiento o la incubación de las células hospedadas con las MVs de *T. cruzi*. En la segunda parte se muestran los resultados del análisis de las vías de entrada de las MVs del parásito a la célula. En las secciones tres y cuatro se presentan los resultados del análisis de expresión génica de células tratadas con MVs o con pequeños ARNs derivados de ARNt. Finalmente, en la última sección se presentan los resultados de la validación de los microarreglos mediante PCR en tiempo real.

4.1 Puesta a punto de las condiciones de incubación de las MVs de *T. cruzi* con la célula hospedera

Para poder analizar el efecto que tienen las MVs producidas por el parásito sobre la célula hospedera, fue necesario determinar las condiciones de interacción, es decir el tiempo durante el cual tendría lugar, y cuál sería la relación de MVs por célula.

Con este fin, en primer lugar se incubaron MVs-Cy3 con las células hospederas durante distintos tiempos (detallados en la sección Materiales y Métodos), y la entrada de las mismas a la célula se verificó por microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos se presentan a continuación (figura 10). En la figura 10 puede apreciarse cómo en todos los tiempos ensayados es posible detectar la presencia del contenido de las MVs en la célula, a través de la señal de la sonda marcada con Cy3. Se seleccionó la condición intermedia (2 horas) como tiempo de incubación.

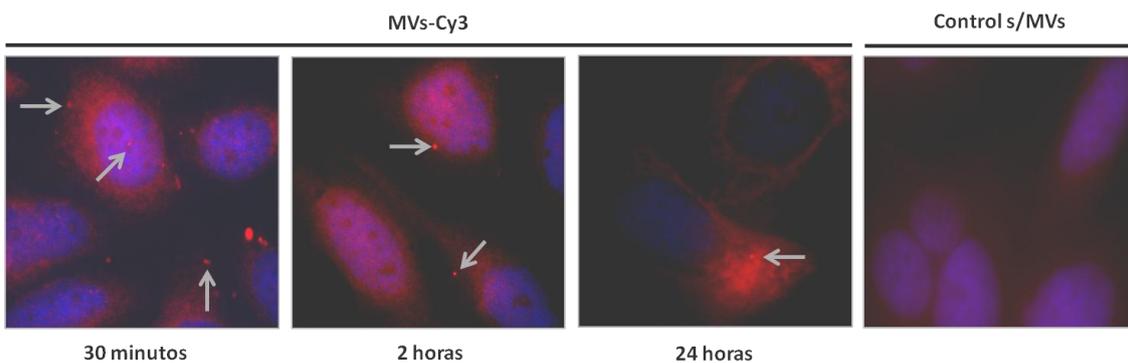


Figura 10. Determinación del tiempo de incubación. Se muestran imágenes representativas de células incubadas con MVs-Cy3 durante 30 minutos, 2 horas y 24 horas. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI, y en rojo las MVs (Cy3). Las flechas indican la presencia de la carga de las MVs dentro de la célula. Se presenta también un control de células sin tratar con MVs (Control s/MVs). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 20X.

Posteriormente se analizó la cantidad de MVs con las que se incubarían las células. En nuestras condiciones experimentales, la fracción microvesicular obtenida a partir de $10 \cdot 10^9$ parásitos rindió $\sim 1.2 \mu\text{g}$ de proteínas (0.12 ng por cada $1 \cdot 10^6$). Para la determinación de la cantidad de MVs con la que se incubarían las células, se ensayaron 5 cantidades diferentes expresadas en μL de preparación ($1 \mu\text{L} = 4 \text{ ng}$ de fracción vesicular) de MVs no electroporadas, las cuales fueron evaluadas por microscopía de fluorescencia. En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos. Es posible observar como la señal proveniente de las MVs aumenta con la cantidad de MVs utilizadas. Se seleccionó el tratamiento con $40 \mu\text{L}$ de MVs (aproximadamente 160 ng) para $0.5 \cdot 10^6$

células. Se consideró que esta cantidad de MVs no parecía saturar a la célula, siendo sin embargo suficiente como para poder detectar efectos en ensayos posteriores. Cabe mencionar que esta cantidad de MVs no necesariamente refleja las condiciones fisiopatológicas, y que actualmente no se cuenta con información clara respecto a la cantidad de MVs que el parásito produce durante la interacción con la célula hospedera.

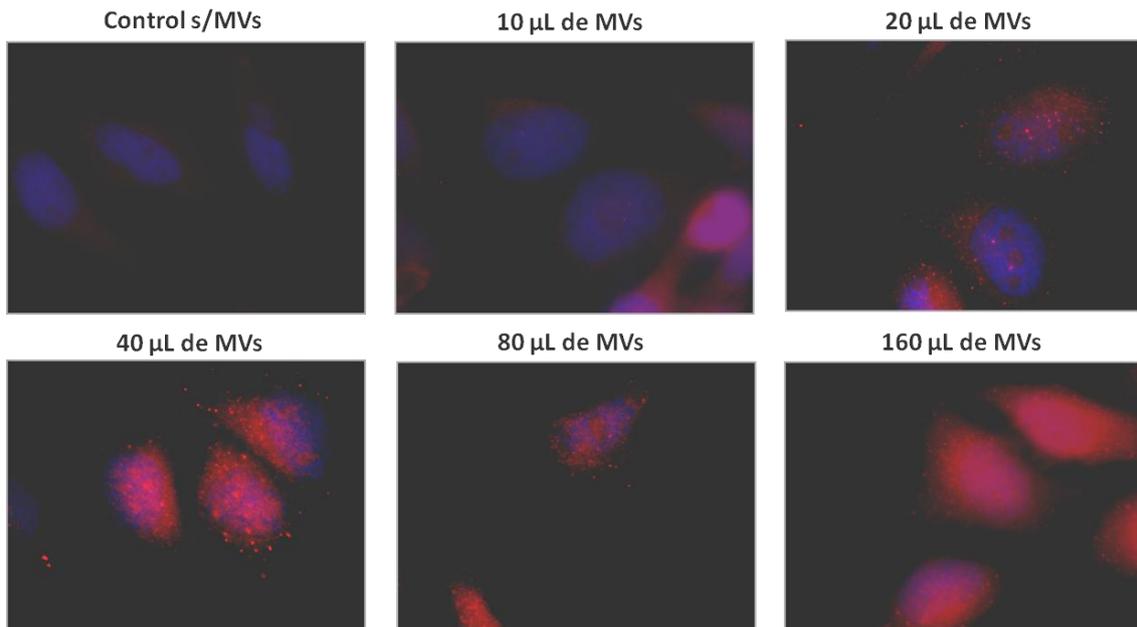


Figura 11. Determinación de la relación MVs-célula. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa incubadas con cantidades crecientes de MVs durante 2 horas. Se muestran imágenes representativas en aumento 20X de cada condición. En azul se observan los núcleos teñidos con DAPI, y en rojo las MVs detectadas por (Cy3).

Como control, en cada ensayo en que las células hospederas fueran tratadas con MVs, la entrada de las mismas se verificó por FISH, siendo el resultado de éste similar en todos los tratamientos, y acorde a lo observado durante la puesta a punto de las condiciones de incubación.

La obtención y purificación de MVs a partir del sobrenadante de *T. cruzi* se realiza de forma rutinaria en el Laboratorio de Genómica Funcional y las fracciones obtenidas han sido analizadas por microscopía de transmisión, durante la puesta a punto del protocolo de purificación. Una imagen representativa de la fracción de MVs obtenidas mediante este protocolo se presenta en la figura S1 (ver sección Anexos). Se observa

que la preparación de MVs obtenida está constituida por una población heterogénea, cuyos tamaños varían entre los 30 y los 1000 nm.

La necesidad de la estandarización de los métodos tanto de purificación como de caracterización de las preparaciones de MVs es un tópico que se encuentra actualmente en discusión. Existen múltiples técnicas para el análisis de fracciones vesiculares, tales como la microscopía electrónica de transmisión (MET), la de fuerza atómica, la dispersión dinámica de luz, y la citometría de flujo. Cada una de éstas presenta tanto ventajas como limitaciones. La MET es la más ampliamente utilizada, y es considerado el “gold standard” para la determinación del tamaño de las vesículas presentes en una preparación [4], al tiempo que permite evaluar también aspectos morfológicos, estructurales y la presencia de ciertos marcadores si se la acopla con inmunomarcado. Sin embargo, no permite la determinación de la concentración de MVs. Más recientemente se ha comenzado a utilizar la tecnología de análisis del seguimiento de partículas o Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), la cual permite evaluar tanto la distribución de tamaños de la población de MVs, así como la concentración de la preparación [92]

Con los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados se definieron las condiciones en las cuales se incubarán las células HeLa para posteriores análisis. De esta forma, en este trabajo la incubación o el tratamiento con MVs implica una incubación de 2 horas, con 40 μL de MVs cada 0.5×10^6 células, a menos que se indiquen condiciones diferentes. Como se menciona en la sección Materiales y Métodos, todos los tratamientos fueron realizados a 37°C , en estufa con 5% CO_2 .

4.1.1 Ensayo de viabilidad de células incubadas con MVs de *T. cruzi*

Con el fin de evaluar posibles efectos adversos del tratamiento con MVs sobre la célula hospedera, las células tratadas en las condiciones definidas fueron sometidas a un ensayo de viabilidad celular mediante tinción con cristal violeta. Los valores de absorbancia obtenidos fueron analizados mediante un test de t para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de células tratadas y no tratadas (para cada tiempo de forma independiente), con un $p < 0,05$. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 12. Es posible apreciar que no se observan diferencias significativas en la viabilidad en ninguno de los tiempos

estudiados. Esto indicaría que el tratamiento con MVs no afecta a las células en cuanto a su viabilidad o capacidad de proliferación.

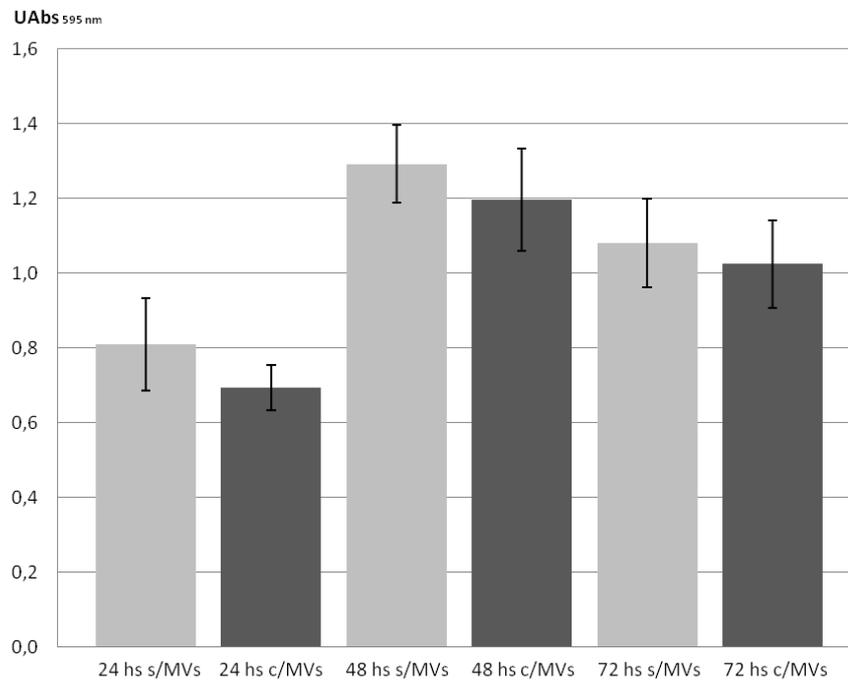


Figura 12. Análisis de la viabilidad de células tratadas con MVs mediante tinción con cristal violeta. Se muestra la absorbancia media a 595 nm y el desvío estándar para los tres tiempos analizados (24, 48 y 72 horas luego de la incubación con MVs), para las células no tratadas (gris claro) y tratadas (gris oscuro). No se observan diferencias significativas en ninguno de los tiempos estudiados. N=7

4.2 Análisis de las vías de entrada de las MVs de *T. cruzi* a la célula hospedera

Se ha descrito en la literatura, en particular para MVs humanas, que el ingreso de las mismas a la célula de destino ocurre mediante distintos tipos de endocitosis [93-98]. Para evaluar si las MVs de *T. cruzi* son capaces de ingresar a las células de mamífero mediante este mecanismo, células HeLa fueron incubadas por distintos tiempos con MVs electroporadas (con sondas marcadas tanto con Cy3 como con FAM) y posteriormente analizadas mediante inmunofluorescencia, empleando diferentes marcadores, como se describe en la sección n° 3 (Materiales y métodos).

Las imágenes obtenidas mediante microscopía muestran que a los 5 minutos de incubación, las MVs se encontrarían a nivel de la membrana plasmática, sin haber ingresado aún a la célula (figura 13-A). Luego de 30 minutos de incubación, la señal proveniente de las MVs no parece colocalizar con la de los anticuerpos α -EEA1 y α -Rab7, marcadores de endosomas tempranos y tardíos respectivamente, si bien tampoco parecen encontrarse a nivel de la membrana plasmática (figura 13-A, B y figura 14-A). En las figuras 13-B y 14-A se observa una colocalización parcial de las MVs con los endosomas tempranos y los tardíos luego de 2 horas de incubación. Finalmente, no se detectó colocalización con los lisosomas (α -LAMP) en ninguno de los dos tiempos analizados (2 o 24 horas).

En todos los casos, la señal de las MVs no fue muy intensa, y el número de MVs por célula fue menor al esperado. Esto puede deberse a que durante la electroporación para el marcado de las MVs, parte de éstas hayan perdido su integridad y no hayan logrado recuperarla. Esto puede haber influido en la capacidad de las MVs de ingresar a la célula, y por tanto en la detección de su colocalización con alguno de los componentes de la vía endocítica. Por otra parte, se evaluaron solo ciertos puntos en el tiempo, con determinados marcadores en cada uno de los mismos, con lo cual ciertas etapas del proceso pueden no haberse observado.

Los resultados obtenidos indicarían que las MVs de *T. cruzi* serían capaces de acceder a la vía endocítica, dado que se observa cierta colocalización de la señal proveniente de las MVs con los endosomas tanto tempranos como tardíos (no así con los lisosomas), por lo que es posible que la utilicen como vía de entrada a la célula. Es

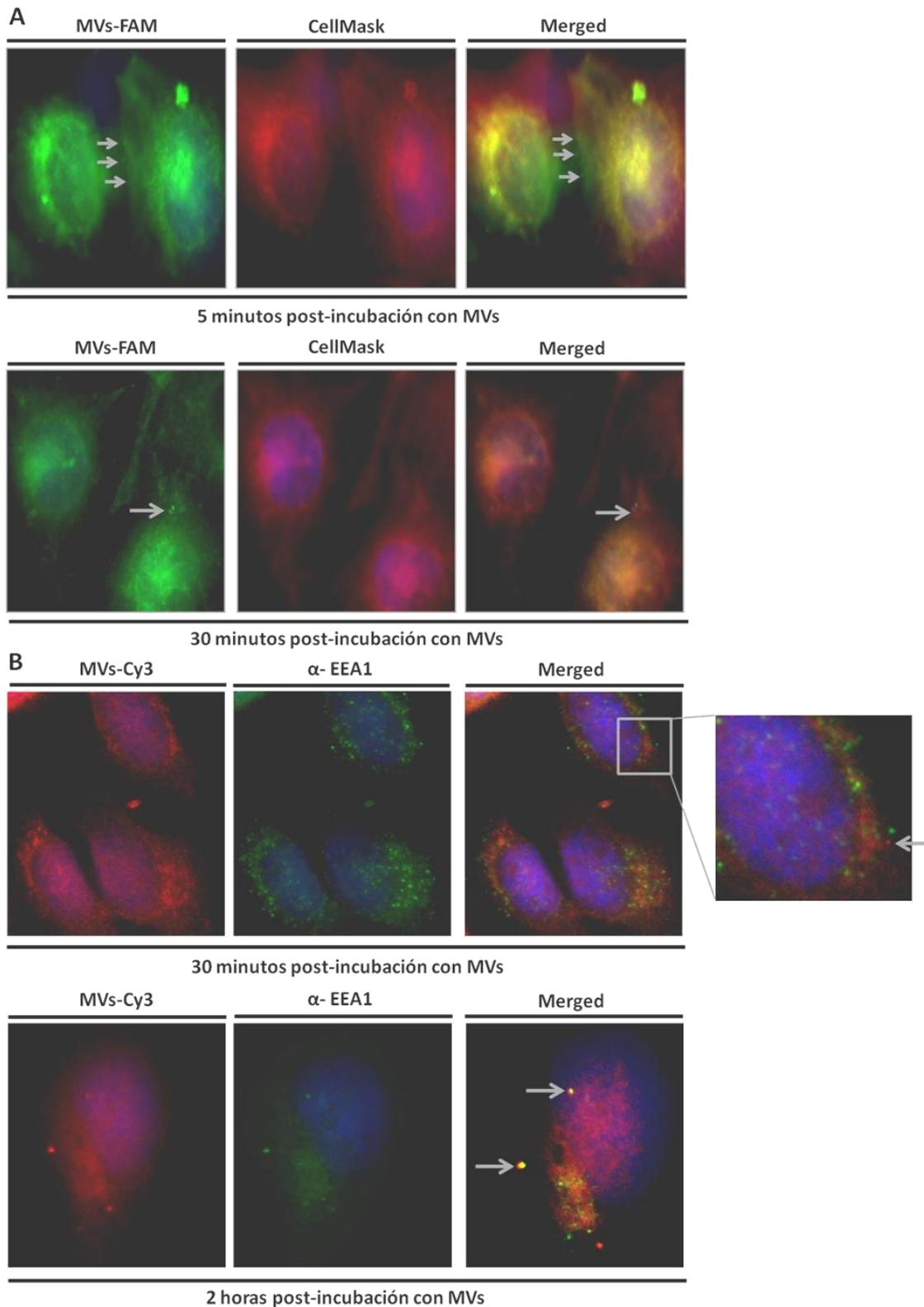


Figura 13. Análisis de las vías de entrada de las MVs de *T. cruzi* a las células de mamífero. A- Incubación con MVs (señal verde) durante 5 (panel superior) o 30 minutos (panel inferior) y posterior marcado de las membranas celulares (CellMask). Las flechas señalan las MVs. **B-** Tratamiento con MVs (señal roja) durante 30 minutos (panel superior) o 2 horas (panel inferior) y posterior marcado de los endosomas tempranos, empleando el anticuerpo α -EEA1 (señal verde). En el panel superior la flecha indica la señal proveniente de las MVs. En el panel inferior las flechas señalan los puntos de colocalización. En todos los casos se tratan de imágenes de microscopía de fluorescencia.

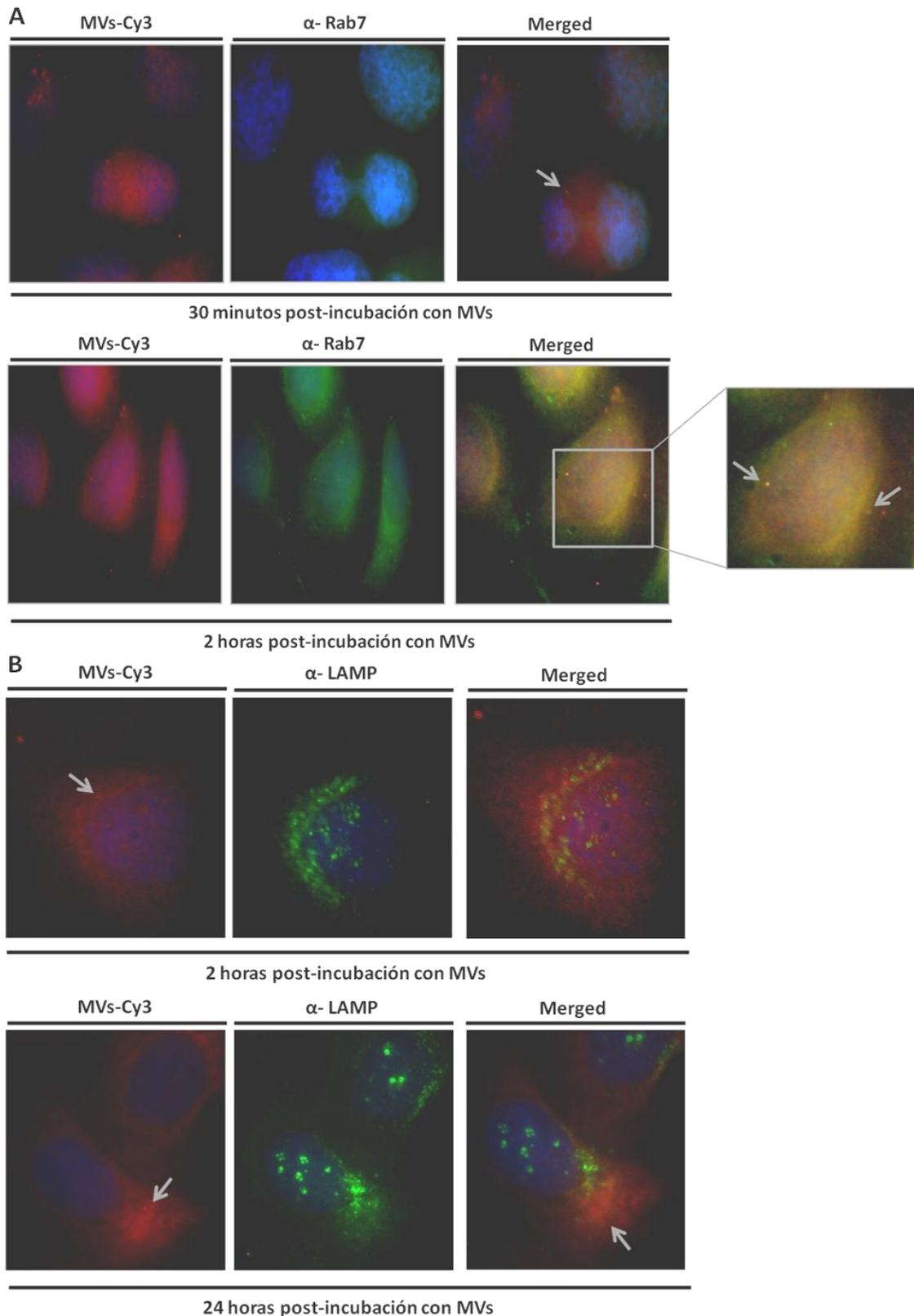


Figura 14. Análisis de las vías de entrada de las MVs de *T. cruzi* a las células de mamífero. Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se muestra: **A-** Tratamiento con MVs (señal roja) durante 30 minutos (panel superior) o 2 horas (panel inferior) y posterior marcado de los endosomas tardíos, empleando el anticuerpo α -Rab7 (señal verde). La flecha del panel superior muestra la presencia de MVs en la célula, mientras que las flechas del panel inferior, en la región ampliada indican los puntos donde se observa colocalización. **B-** Tratamiento con MVs (señal roja) durante 2 (panel superior) o 24 horas (panel inferior) y posterior marcado de los lisosomas (α -LAMP, en verde). En todos los casos las flechas indican la señal proveniente de las MVs.

importante tener en cuenta que es posible que los componentes tanto proteicos como nucleicos de las MVs deban acceder al citosol para poder ejercer su acción, tal como se ha visto para proteínas que actúan en el citosol de las células receptoras y ARNs mensajeros que son traducidos en las mismas [14, 19]. Especialmente en el contexto de la interacción célula hospedera-parásito, el modo en que las MVs ingresen a la célula hospedera debería facilitar o permitir el acceso de los componentes a sus sitios de acción. De esta forma, si las MVs del parásito siguieran la vía endocítica hacia los lisosomas, el contenido de las mismas se vería degradado, y no podría ejercer su acción dentro de la célula hospedera, por lo que tiene sentido no haber detectado colocalización con estos organelos, si bien no es posible descartar, dado el bajo número de MVs detectadas, que haya en algún punto interacción con este compartimento. Asimismo, de utilizar la vía endocítica como mecanismo para internalizarse en la célula, será necesario algún mecanismo que permita el acceso al citosol a aquellos componentes de las MVs que lo requieran. De todos modos, los ensayos realizados no permiten concluir con certeza que sea la vía endocítica la que las MVs de *T. cruzi* explotan para ingresar a la célula y no puede descartarse la posibilidad de que ingresen a la célula por otro mecanismo.

El ingreso de las MVs a sus células destino mediante endocitosis o a través de la fusión a nivel de la membrana plasmática es uno de los aspectos de la biología de las vesículas extracelulares sobre los cuales actualmente se debate. La mayor parte de los estudios realizados en células de mamífero apuntan a que el ingreso tiene lugar mediante endocitosis, si bien no en todos los casos se trata del mismo tipo. En el caso de células dendríticas y macrófagos, la fagocitosis es el mecanismo que permite la entrada de MVs, colaborando con la posterior presentación de antígenos transportados por éstas [94-95]. En células de glioblastoma, el ingreso de MVs del mismo origen tiene lugar por endocitosis dependiente de balsas o rafts lipídicos [93], mientras que en células de cáncer de ovario sucede por endocitosis dependiente de clatrina [98]. Las diferencias pueden estar relacionadas al hecho de que se trata de distintos tipos celulares, con distintas funciones y a que en algunos casos se emplean MVs del mismo origen que las células de destino mientras que en otros se trata de MVs derivadas de un tipo celular diferente. Independientemente del mecanismo concreto de endocitosis en cada uno de estos casos, en todos se trata de un proceso

dependiente de energía, en oposición con la fusión, que no depende de ésta. Parolini y colaboradores (2009) demostraron que exosomas de células de melanoma suministrados externamente a este mismo tipo celular son internalizados por éstas no por endocitosis, sino mediante fusión, siendo luego capaces de interactuar con vesículas citoplasmáticas como endosomas y lisosomas, aportando así evidencias a favor de un mecanismo no dependiente de energía [99].

La interacción entre MVs y células de diferentes especies ha sido poco estudiada en relación al mecanismo de internalización. Marcilla y colaboradores (2012) reportaron que la internalización de MVs de *Echinostoma caproni* en células de intestino de rata tenía lugar a 37°C pero no a 4°C, lo cual indica que se trataba de un proceso dependiente de energía o relacionado a la fluidez de la membrana plasmática [26]. Los autores proponen que posiblemente se trate de endocitosis, pero no realizan ensayos adicionales para confirmarlo, así como tampoco evalúan el destino de los componentes de las MVs de este helminto. Anteriormente, Silverman *et al.* (2010), reportaron que exosomas de *L. donovani* pueden ser internalizados desde el medio extracelular por macrófagos tanto murinos como humanos, así como su liberación dentro de células infectadas [29]. Los autores sugieren tres posibles mecanismos para la entrega de la carga de las MVs a las células hospederas infectadas. Por un lado, parásitos que infectan una célula podrían liberar exosomas directamente dentro de ésta, los cuales a su vez podrían volcar su contenido al citosol a través de sus propios transportadores de membrana. Otra posibilidad es que los exosomas liberados por el parásito, que se encuentra dentro de un fagolisosoma, se fusionen con la membrana de este último, liberando así su contenido al citosol. Finalmente, plantean un mecanismo por el cual los exosomas del parásito puedan sufrir endocitosis reversa desde el fagolisosoma, y desde este punto hacer uso del tráfico retrógrado para acceder al trans-Golgi. Esto le permitiría acceder a todo el sistema de secreción y al citosol. Por otra parte, se conocen algunos mecanismos por los que toxinas de diversos orígenes cuyos blancos son citosólicos, acceden al citosol de las células hospederas luego de ser endocitados. La toxina diftérica es capaz de insertarse y atravesar la membrana endosomal en respuesta al pH ácido de los endosomas. Otras toxinas como las toxinas shiga, la toxina colérica, la ricina y la exotoxina A de *Pseudomonas*, son transportadas de forma retrógrada desde los endosomas, hacia el aparato de Golgi y

de aquí hacia el retículo endoplásmico (RE), desde donde son translocadas al citosol. La membrana del RE tiene un bajo contenido de colesterol, lo cual probablemente la hace más permeable que la membrana plasmática y la de los endosomas, favoreciendo el transporte de glicoproteínas e incluso ácidos nucleicos [100-101].

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados obtenidos, es posible que de ingresar mediante endocitosis, las MVs de *T. cruzi* accedan al sistema de transporte retrógrado de la célula desde los endosomas, y desde allí aquellos componentes que deban hacerlo podrían acceder al citosol para cumplir su función.

Otro de los aspectos a tener en cuenta y sobre los cuales se discute, es el del rol que juegan las proteínas de membrana tanto de las MVs como de la célula que las recibe en el proceso de internalización. Algunos autores plantean que las proteínas de membrana son claves para una internalización exitosa, mientras que otros proponen que es la composición lipídica de las MVs el factor determinante, si bien no descartan un papel “auxiliar” de las proteínas [102]. Un análisis reciente del proteoma de MVs de *T. cruzi* de la cepa Dm28c (empleada en este trabajo), reveló que las MVs tanto de epimastigotas como de tripomastigotas metacíclicas contienen proteínas tales como las glicoproteínas gp82, gp63 y miembros de la familia de las trans-sialidasas, que normalmente participan en la interacción entre el parásito y la célula hospedera, particularmente en la adhesión del parásito a la célula [54]. Es posible suponer que estas proteínas podrían colaborar en el ingreso de las MVs al asociarse a los receptores de la superficie celular con los que típicamente interactúan durante la invasión del parásito.

Los resultados obtenidos representan un primer acercamiento a la interacción MVs-célula hospedera desde el punto de vista celular. Los mismos muestran que las MVs de *T. cruzi* son capaces de interactuar con la vía endocítica de la célula hospedera, pero no permiten afirmar que sea este el único mecanismo por el que ingresan. Sería necesario repetir los ensayos realizados, empleando otro método de marcado de las MVs (por ejemplo, PKH26, un marcador de membranas muy utilizado actualmente para el marcado de vesículas y exosomas) evitando la electroporación de las mismas. De forma complementaria, conociendo el contenido proteico de las MVs, podría

evidenciarse la vía de entrada mediante inmunofluorescencia, lo cual permitiría además seguir el camino que este componente realiza dentro de la célula. Asimismo, los mismos ensayos podrían realizarse luego de la aplicación de inhibidores de endocitosis o a 4°C, para poder contar con más evidencias que apoyen o descarten el ingreso de las MVs por endocitosis. Finalmente, el análisis y seguimiento de las MVs a través de la célula hospedera por microscopía electrónica proporcionará evidencias más contundentes acerca del mecanismo de internalización y el transporte intracelular de las MVs.

4.3 Análisis de expresión génica de células tratadas con MVs de *T. cruzi*: ensayos de microarreglos.

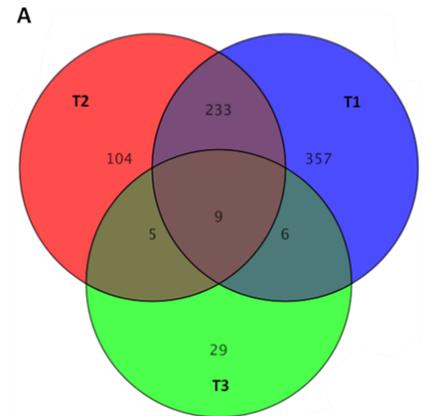
Con el fin de evaluar los efectos del tratamiento con MVs de *T. cruzi* a nivel de ARN mensajero se llevaron a cabo estudios de expresión génica utilizando microarreglos. Células HeLa fueron tratadas con MVs en las condiciones establecidas durante la puesta a punto, el ARN total de las mismas fue extraído a las 6 (tiempo 1), 24 (tiempo 2) y 72 (tiempo 3) horas luego de la incubación y finalmente analizado empleando la plataforma Agilent de microarreglos.

Luego de realizar el análisis estadístico, se detectó que 5580 genes se encontraban diferencialmente expresados con respecto a las células control, en los tres tiempos estudiados ($p < 0,05$). De éstos, 743 se encontraban 3 veces más o menos expresados con respecto al control (presentaron un *fold change* (FC) mayor o igual a 3) en al menos alguno de los tiempos evaluados. En el tiempo 1 fueron 605 los genes que se encontraban diferencialmente expresados, con un *fold change* ≥ 3 , mientras que en los tiempos 2 y 3 se registraron 351 y 49 genes con este comportamiento respectivamente (Tabla 1). De los 605 genes diferencialmente expresados en el tiempo 1, 244 también se encuentran modificados en el tiempo 2 (manteniendo el *fold change*), mientras que sólo 15 también lo están en el tiempo 3, como se observa en la figura 15-A. En la misma puede verse a su vez que en el tiempo 1, 222 genes se encontraban sobre-expresados y 383 sub-expresados. En el caso del tiempo 2, son 239 los sobre-expresados y 112 los sub-expresados, compartiendo 144 y 98 genes con los modificados en el tiempo 1 respectivamente (figura 15-B, C). Finalmente, en el caso del tiempo 3, de los 49 genes modificados, 20 se encontraban sobre-expresados y 29 sub-expresados. Estos resultados se resumen en la tabla 1.

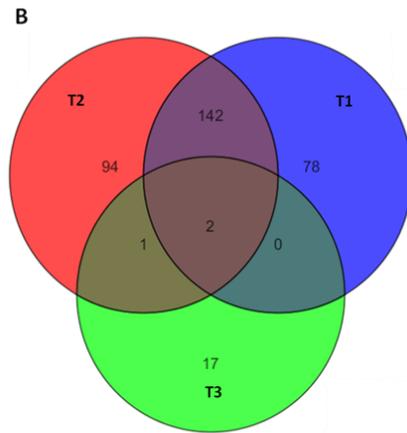
Tabla 1. Resumen del número de genes identificados como diferencialmente expresados (D.E.) en los distintos tiempos evaluados, post-incubación con las MVs de *T. cruzi* (P.I.). En todos los casos se tratan de diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p \leq 0.05$). Se detalla para cada condición el número de genes sobre y sub-expresados, así como los genes que se encontraban modificados exclusivamente en un determinado tiempo ("Exclusivos"). FC: *fold change*

	N° de genes	Sobre-expresados	Sub-expresados	Exclusivos
Genes D.E. respecto al control	5580	-	-	-
Genes D.E. con FC ≥ 3	743	-	-	-
Genes D.E. con FC ≥ 3 6 hs P.I.	605	222	383	357
Genes D.E. con FC ≥ 3 24 hs P.I.	351	239	112	104
Genes D.E. con FC ≥ 3 72 hs P.I.	49	20	29	29

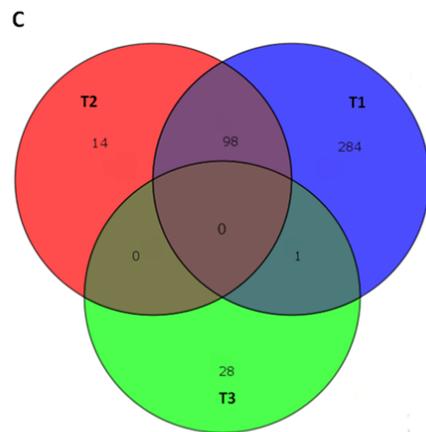
Como puede observarse en la figura 15, una importante proporción de los genes modificados en el tiempo 1, también lo están en el tiempo 2. Asimismo, en el tiempo 3 el número de genes modificados fue mucho menor que en los tiempos anteriores. Esto se ve reflejado en el perfil de expresión, que se observa en la figura 16. En la misma se muestran los valores de intensidad de la señal promedio normalizados, para cada condición incluyendo la condición control. (Cada línea representa el comportamiento en el tiempo de un gen en particular). Cabe mencionar que se trata de un microarreglo de un color, es decir, que cada muestra es analizada en un chip independiente y la comparación se realiza posteriormente, no por competencia por un sitio en el chip. Esto permite observar el perfil tanto de la muestra control (contra la que luego se compara) como de los tratamientos. El perfil general indicaría que a las 6 y 24 horas se registran los principales cambios en la expresión génica, mientras que a las 72 horas la mayoría de los ARN mensajeros celulares se encuentran nuevamente en niveles similares a los del control. Puede observarse que gran parte de los genes se encuentran sobre-expresados en los tiempos 1 y 2 y vuelven a sus niveles normales en el tiempo 3. De forma similar, otros tantos genes exhiben el comportamiento opuesto (se encuentran sub-expresados en los tiempos 1 y 2 volviendo a la normalidad en el tiempo 3).



Genes diferencialmente expresados con $FC \geq 3$



Genes sobre expresados con $FC \geq 3$



Genes sub expresados con $FC \geq 3$

Figura 15. Diagramas de Venn de los genes diferencialmente expresados en los distintos tiempos estudiados. A: Genes modificados con un fold change mayor o igual a 3. **B:** Genes sobre-expresados, con un fold change mayor o igual a 3. **C:** Genes sub-expresados, con un fold change mayor o igual a 3. T1: tiempo 1, 6 horas (azul); T2: tiempo 2, 24 horas (rojo); T3: tiempo 3, 72 horas (verde).

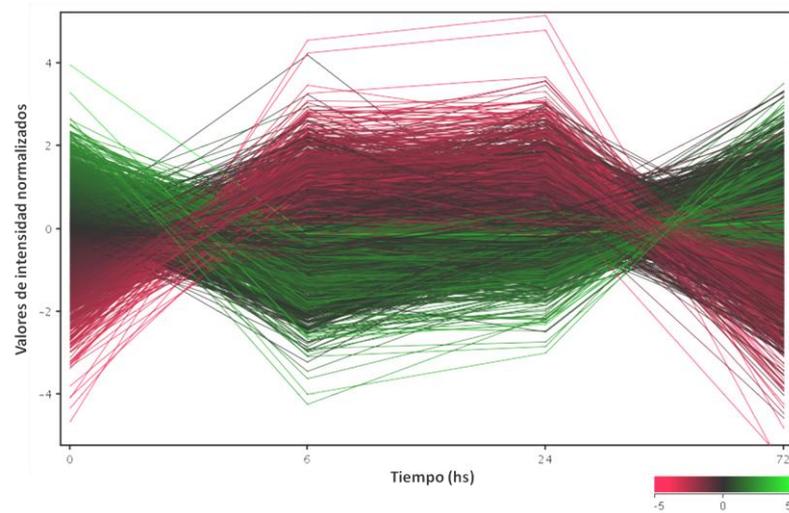


Figura 16. Perfil de expresión de ARNs mensajeros de células tratadas con MVs. Se muestran los valores de intensidad normalizados para cada gen en los diferentes tiempos (6, 24 y 72 horas luego de la incubación), incluido el control. A modo de referencia se muestra la escala de intensidades

El patrón observado en la figura 16, así como lo que se observa en los diagramas de Venn presentados en la figura 15 parecen indicar que los perfiles de expresión génica de las células 6 y 24 horas luego del tratamiento con MVs son muy similares entre sí, mientras que a las 72 horas, el perfil de expresión se asemeja al de las células control. Para verificar esto se realizó un análisis de clusters. El resultado obtenido (figura 17) condice con lo observado tanto en el perfil como en los diagramas de Venn, ya que muestra que los tiempos 1 y 2 se parecen más entre sí que al control o al tiempo 3, resultando estos dos agrupados entre sí. Teniendo esto en cuenta, para análisis posteriores, en algunos casos se trabajó con aquellos genes que se encontraban modificados en ambos tiempos, de forma de evaluar la respuesta general y sostenida al menos por 24 horas.

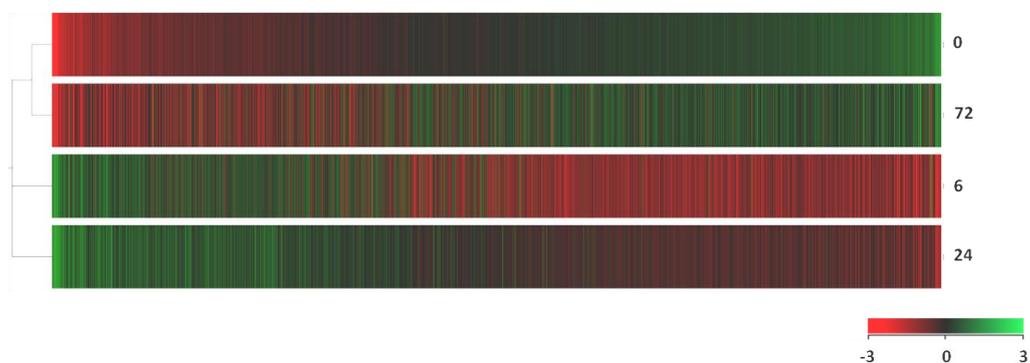


Figura 17. Análisis de clusters de los perfiles de expresión de ARNs mensajeros de células tratadas con MVs. Para la visualización, los genes se ordenaron según el control. A modo de referencia se muestra la escala de intensidades normalizadas. 0: control, 6, 24 y 72: 6, 24 y 72 horas post-tratamiento con MVs.

Los resultados obtenidos parecen indicar que las MVs de *T. cruzi* desencadenan un cambio en el perfil de expresión génica celular que decae en el tiempo, siendo más pronunciado a las 6 horas luego del tratamiento y volviendo casi a la normalidad luego de 72 horas. Dado que cada condición fue realizada por triplicado, y que la entrada de las MVs en cada ensayo fue verificada por microscopía de fluorescencia, es poco probable que la tendencia observada se deba a un artefacto técnico. De todos modos, sería deseable realizar una mayor caracterización previa de la población de MVs utilizada en cada ensayo, de modo de contar con más soporte a favor de la reproducibilidad y validez de los resultados obtenidos. Asimismo, la inclusión y análisis de otros intervalos de tiempo, por ejemplo puntos entre las 24 y las 72 horas, permitirían confirmar la tendencia observada.

Considerando que la interacción entre las MVs y las células hospederas tendría lugar de forma previa o simultánea a la interacción con los propios parásitos, en el contexto de una infección que se supone favorecen, es posible pensar que los cambios que estas susciten, tendrán lugar de forma relativamente rápida. Asimismo, si consideramos la posibilidad de que la interacción de las MVs facilite el ingreso de los parásitos a la célula, es posible que no sea necesario que los cambios que estas generen sobre las mismas se vean sostenidos en el tiempo, ya que una vez que el parásito ingresa, el mismo proveerá de los estímulos necesarios para continuar con el proceso de infección. En las condiciones experimentales de este trabajo, el estímulo que representan los parásitos se encuentra ausente, incluso luego de 72 horas, lo cual permite observar el decaimiento de la respuesta generada por las MVs.

4.3.1 Análisis ontológico

A partir de las listas de genes diferencialmente expresados en cada tiempo, se realizó (previo al análisis de vías) un análisis de enriquecimiento de términos ontológicos. De esta manera, se intentó detectar si existían procesos biológicos asociados a los genes diferencialmente expresados, enriquecidos con respecto a un grupo de genes de referencia. Para ello se trabajó con la herramienta DAVID, disponible libremente. La misma permite al usuario analizar su lista de genes de interés, seleccionando asimismo el conjunto de genes de referencia, que por defecto comprende todos los genes del genoma humano, pero que puede modificarse,

seleccionando por ejemplo todos los genes presentes en un chip de microarreglos. Empleando la herramienta *Functional Annotation Clustering*, es posible determinar qué grupos de términos ontológicos relacionados entre sí se encuentran enriquecidos para los genes de interés. Los distintos grupos o clusters de términos tienen asignado un *enrichment score* (E.S.), lo cual permite ordenarlos, siendo de mayor relevancia aquellos clusters con E.S. mayores. El E.S. puede calcularse como el logaritmo negativo de la media geométrica de los p-valores de enriquecimiento de cada uno de los términos que componen el cluster. De este modo, un valor de E.S. de 1,3 es equivalente a un p-valor de 0.05, siendo los clusters con valores iguales o superiores a 1,3 los más significativamente enriquecidos. Los resultados de este análisis se presentan en las tablas 2, 3 y 4, en las cuales se incluyen clusters con E.S. de hasta 0,8 (equivalente a un p-valor de 0,1) con el fin de tener en cuenta clusters potencialmente interesantes en relación a la pregunta biológica de fondo.

A partir de los resultados obtenidos, puede verse que muchos de los procesos biológicos que resultaron estar enriquecidos en el tiempo 1, también lo están en el tiempo 2, lo cual es coherente con los perfiles de expresión en cada uno de estos tiempos. Asimismo, aquellos procesos biológicos asociados a los genes modificados en el tiempo 3, si bien son menos que en los tiempos anteriores (lo cual es coherente teniendo en cuenta que se trata de un número menor de genes) también son compartidos con los tiempos anteriores. Esto podría indicar que el tratamiento con MVs desencadena ciertas respuestas que son mantenidas a lo largo del tiempo, mientras que otras parecen decaer entre las 24 y las 72 horas.

Por otra parte, es posible distinguir grandes grupos de procesos que se ven afectados por el tratamiento con MVs, ya que muchos de los clusters enriquecidos representan procesos biológicos estrechamente relacionados entre sí. Entre estos es posible destacar aquellos relacionados con la respuesta a estímulos y la transducción de señales correspondiente, la locomoción y migración celular (relacionadas con la reorganización del citoesqueleto), la respuesta inmune, el metabolismo y transporte de lípidos (incluyendo hormonas lipídicas) y el desarrollo y la diferenciación celular, los cuales de cierto modo engloban algunos de los otros procesos (respuesta a estímulos, la transducción de señales y la organización del citoesqueleto).

Finalmente, cabe mencionar que estos resultados representan un primer análisis exploratorio de los datos, que no necesariamente implica que los procesos identificados como relevantes sean efectivamente los que tienen lugar, teniendo en cuenta las características del análisis de términos ontológicos.

Algunos de los procesos biológicos que se ven enriquecidos tienen sentido considerando el contexto experimental. El tratamiento con MVs constituye una importante fuente de estímulos para la célula, independientemente del contenido de las mismas, por lo que no es sorprendente que se desencadenen procesos como la transducción de señales y vías relacionadas a la comunicación celular. Considerando que es posible que las MVs utilicen la vía de endocitosis para ingresar a la célula, es de esperarse un reordenamiento del citoesqueleto y con esto que se vean alteradas también los mecanismos que lo regulan u aquellos relacionados. Por otra parte, todos aquellos procesos relacionados con la respuesta inmune también son coherentes, ya que las MVs contienen múltiples moléculas que serán reconocidas como ajenas, generando así una respuesta que apunte a la protección. Por otra parte, otros de los procesos biológicos que parecen verse enriquecidos no tienen una relación evidente con el fenómeno que se está estudiando, como por ejemplo, la coagulación o el desarrollo óseo. Es posible que el análisis de vías contribuya a comprender por qué el análisis ontológico identifica a estos procesos como afectados.

Tablas 2, 3 y 4. Resultados obtenidos mediante análisis ontológico. Procesos biológicos (en términos de ontología de genes) asociados a los genes diferencialmente expresados ($p < 0.05$, $fold\ change \geq 3$) en el tiempo 1 (6 horas post tratamiento con MVs), 2 (24 horas post tratamiento con MVs) y 3 (72 horas post tratamiento con MVs). Se presentan todos los procesos que presentaron un valor de E.S. $\geq 0,8$. E.S.: *enrichment score*.

TIEMPO 1 (6 horas)	
Proceso biológico	E.S.
Diferenciación celular, desarrollo	4,84
Angiogénesis	3,27
Regulación de la diferenciación celular y desarrollo	2,65
Regulación de la comunicación celular y transducción de señales	1,84
Regulación de locomoción y migración celular	1,64
Metabolismo de hormonas lipídicas	1,61
Contracción de musculo liso, procesos del sistema circulatorio	1,56
Regulación de procesos biológicos	1,55
Metabolismo de lípidos	1,51
Transporte de lípidos	1,48
Desarrollo óseo	1,43
Desarrollo de células epiteliales	1,36
Regulación de la producción de citoquinas	1,35
Metabolismo lipídico	1,33
Transducción de señales	1,05
Regulación de la locomoción en respuesta a estímulos	0,97
Regulación de la angiogénesis	0,91
Regulación de la adhesión celular	0,90
Coagulación	0,89
Regulación de la respuesta inflamatoria	0,88
Respuesta a estímulos	0,88
Respuesta al Ca^{2+}	0,86

TIEMPO 2 (24 horas)

Proceso biológico	E.S.
Diferenciación celular, desarrollo	4,60
Regulación de locomoción y migración celular	1,98
Regulación de señalización mediada por pequeñas GTPasas	1,86
Respuesta a estímulos	1,75
Organización del citoesqueleto	1,74
Desarrollo óseo	1,68
Regulación de la apoptosis	1,67
Adhesión celular	1,39
Metabolismo de glicoproteínas	1,34
Desarrollo de células musculares	1,33
Respuesta inmune humoral	1,29
Respuesta a estímulos	1,28
Metabolismo de hormonas lipídicas	1,24
Localización y transporte	1,20
Migración celular	1,12
Respuesta a estímulos	1,11
Regulación del crecimiento celular	1,10
Transporte de lípidos	1,09
Contracción muscular	0,94
Regulación de transducción de señales	0,92
Regulación de endopeptidasas	0,88
Coagulación	0,83
Quimiotaxis de leucocitos	0,81
Regulación de la respuesta inflamatoria	0,80

TIEMPO 3 (72 horas)

Proceso biológico	E.S.
Respuesta a estímulos	2,18
Coagulación, respuesta al daño	2,08
Diferenciación celular, desarrollo	1,86
Regulación de procesos biológicos	1,13
Respuesta a estímulos	1,07

4.3.2 Análisis de vías

A partir de los de genes diferencialmente expresados en cada uno de los tiempos se realizó el análisis de vías, con el fin de determinar cuáles se veían afectadas por el tratamiento con MVs. Para ello se utilizó tanto el software GeneSpring (Agilent Technologies) como la herramienta DAVID, considerando que las distintas herramientas realizan el análisis empleando diferentes bases de datos. La obtención de información congruente entre herramientas haría referencia a la robustez de los resultados observados, independientemente de las particularidades de las bases de datos empleadas

Se analizaron las listas de genes diferencialmente expresados en los tres tiempos post-tratamiento con MVs, así como los genes modificados tanto a las 6 como a las 24 horas, en primer lugar mediante el software GeneSpring, seleccionándose aquellas vías que presentaran un p-valor $\leq 0,05$ y en las cuales participaran al menos 3 genes de los presentes en las listas. Los resultados de este análisis se presentan en las tablas suplementarias S3, S4 y S5. Para los genes del tiempo 3 (72 horas) no se encontraron vías que cumplieran con los criterios de selección. Por su parte, en los tiempos 1 y 2, sí se detectaron vías significativamente modificadas, las cuales a su vez guardan estrecha relación con lo observado en el análisis de enriquecimiento de términos ontológicos. Por otra parte, se realizó el mismo análisis a través de la herramienta DAVID, obteniéndose resultados que coinciden parcialmente con los obtenidos a través de GeneSpring (ver tablas suplementarias S3 y S4). Las vías identificadas como modificadas por el tratamiento con MVs a través de DAVID también se encuentran muy relacionadas con los términos ontológicos que se encontraban enriquecidos.

Posteriormente, se seleccionaron ciertas vías para ser analizadas con mayor profundidad. En primer lugar, se analizaron aquellas vías que fueron identificadas como afectadas por el tratamiento con MVs a través de las dos herramientas utilizadas. Luego, se seleccionaron otras que se consideraron relevantes en el contexto de la pregunta biológica, o interesantes teniendo en cuenta el análisis ontológico. La lista completa de estas vías se presenta en la tabla 5. Para el análisis de estas vías, se identificaron los genes modificados, el sentido de la modificación (sub o sobre-expresión) y se determinó su función en la vía. Con esta información se buscó

determinar si la vía en cuestión se encontraba activa o no. Las vías analizadas y su posible implicancia en el contexto del ingreso del parásito a la célula se presentan a continuación.

Tabla 5. Vías seleccionadas para su análisis en profundidad. Se muestra el nombre de la vía, la herramienta mediante la cual se la identificó como modificada y en cual o cuales de las condiciones evaluadas se vio afectada. En todos los casos se trata de vías que cumplen con los criterios de selección mencionados en el texto (p -valor $\leq 0,05$ y al menos tres genes de la vía modificados).

Vía	Herramienta	Condición
Cascada del complemento y la coagulación	GeneSpring/DAVID	6 hs
Vía de receptores NOD	GeneSpring/DAVID	6 y 24 hs
Señalización por IL-1	GeneSpring	6 hs
Señalización por Rho GTPasas	DAVID	6 y 24 hs
Regulación del citoesqueleto de actina	GeneSpring	6 y 24 hs
Metaloproteinasas de matriz	GeneSpring/DAVID	24 hs
Vía de señalización de Wnt	GeneSpring/DAVID	6 y 24 hs

4.3.2.1 Vías del complemento y la coagulación

El sistema del complemento es un elemento clave en la respuesta inmune innata. El mismo se compone de una serie de proteínas plasmáticas que reaccionan una con la otra para finalmente opsonizar patógenos y desencadenar una respuesta inflamatoria que contribuya al control de una infección [103]. Por su parte, el proceso de coagulación es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis. La cascada de coagulación involucra una serie de proteínas, también plasmáticas, que al igual que los componentes del complemento reaccionan entre sí para dar lugar a la formación del coágulo de fibrina. Además de las similitudes que ambas cascadas presentan a nivel estructural, existen fuertes evidencias de que las dos vías se encuentran conectadas entre sí a nivel funcional, existiendo asimismo una regulación recíproca entre ambas [104-105].

Las vías interconectadas del complemento y la coagulación fueron detectadas como alteradas por el tratamiento con MVs en el tiempo 1 (6 horas post-incubación), por las dos herramientas de análisis. La figura suplementaria S2 muestra el resultado proporcionado por la herramienta DAVID, sobre el cual se han marcado los genes afectados, indicando también si se encuentran reprimidos o activados, mientras que en la figura 18 se presenta una imagen simplificada de la vía donde también se señalan

los genes afectados. En la misma puede verse que el tratamiento con MVs tiene efectos sobre miembros de ambas vías. Por un lado, el factor de coagulación X, central para la activación de esta vía, se encuentra sub-expresado. Asimismo, dos reguladores negativos de la vía de la coagulación (la proteína C y su co-factor, la proteína S) se encuentran sobre-expresados, lo cual indicaría que la vía de la coagulación se encuentra reprimida. En cuanto al sistema del complemento, dos de los principales reguladores negativos de la vía (el factor H del complemento y la proteína de unión al componente del complemento 4, C4BP), se encuentran sobre-expresados, con lo que esta vía también estaría inactiva.

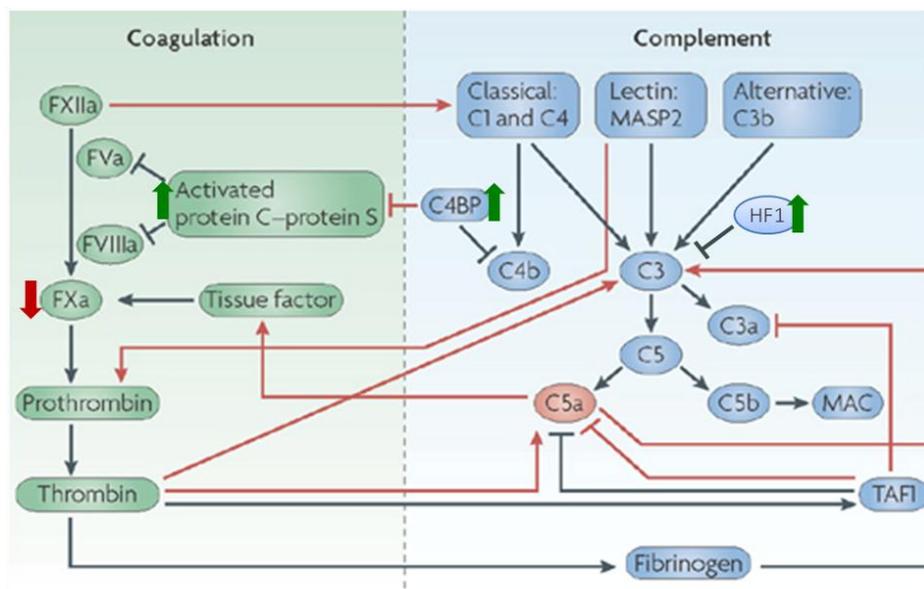


Figura 18. Vías del complemento y la coagulación. Imagen simplificada de las vías interconectadas de la coagulación y el complemento. Se muestran los principales componentes de estas vías y se indican los genes afectados por la incubación con MVs. Las flechas rojas indican sub-expresión y las verdes sobre-expresión. Tomado y adaptado de [106]

La inactivación del sistema del complemento (así como la de la coagulación) podría ser beneficiosa para el parásito en el contexto de la infección. De hecho, se han reportado varios mecanismos por los cuales *T. cruzi* es capaz de inhibir el sistema del complemento, aumentando así la capacidad infectiva del parásito. La proteína reguladora del complemento (CRP), producida por el parásito, se une a los componentes C3b y C4b, impidiendo la formación de las convertasas de C3 y C5, fundamentales para la acción del complemento. Asimismo, el parásito genera la proteína T-DAF (del inglés *T. cruzi*-decay accelerating factor), la cual se une a C3b acelerando el decaimiento de las convertasas o impidiendo directamente su formación

[107]. Además de estas dos proteínas, la calreticulina de *T. cruzi* (Tc-CRT) también ha sido identificada como un efector de la inhibición del complemento a través de la interacción con componentes de la vía clásica de activación de este sistema [107-110]. Es interesante mencionar que Tc-CRT es transportada en las MVs de *T. cruzi* [54], y si bien su modo de acción reportado sobre el sistema del complemento no es en principio a través de la modulación de la expresión génica, su presencia en las MVs sugiere que uno de las posibles acciones de estas sea la inactivación del complemento (más allá de otras posibles funciones de Tc-CRT). Dado que el parásito parece emplear varias estrategias para asegurar la inhibición del sistema del complemento actuando en diferentes puntos de este, es posible que la acción de las MVs a nivel de la expresión de ciertos genes represente una estrategia complementaria o adicional, independientemente de qué componente de las mismas sea responsable de ésta.

4.3.2.2 Vía de receptores tipo NOD (NLR)

Los receptores del tipo NOD (NOD: nucleotide-binding oligomerization domain), son una familia de receptores intracelulares capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o asociados al daño celular (DAMPs), fundamentales durante la respuesta inmune innata. La detección de señales de patógenos en el citoplasma por parte de estos receptores, induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias a través de NF- κ B, entre otros. Por otra parte, tiene lugar también la formación de un complejo multiproteico denominado inflamasoma, que permite la maduración y liberación de interleuquina-1 β (IL-1 β) e interleuquina-18 (IL-18) [111-112]. La vía de los NLR se vio afectada a las 6 horas luego del tratamiento con MVs, según el análisis con GeneSpring, y a las 24 horas según el análisis con DAVID. Como puede observarse en la figura 19, tanto los mensajeros que codifican para proteínas involucradas en la transducción de señales, como los que codifican para algunos de los productos finales de la vía (IL-6, IL-18, CCL2, CXCL2) se encuentran sobre-expresados, indicando una activación de la vía de señalización mediada por estos receptores.

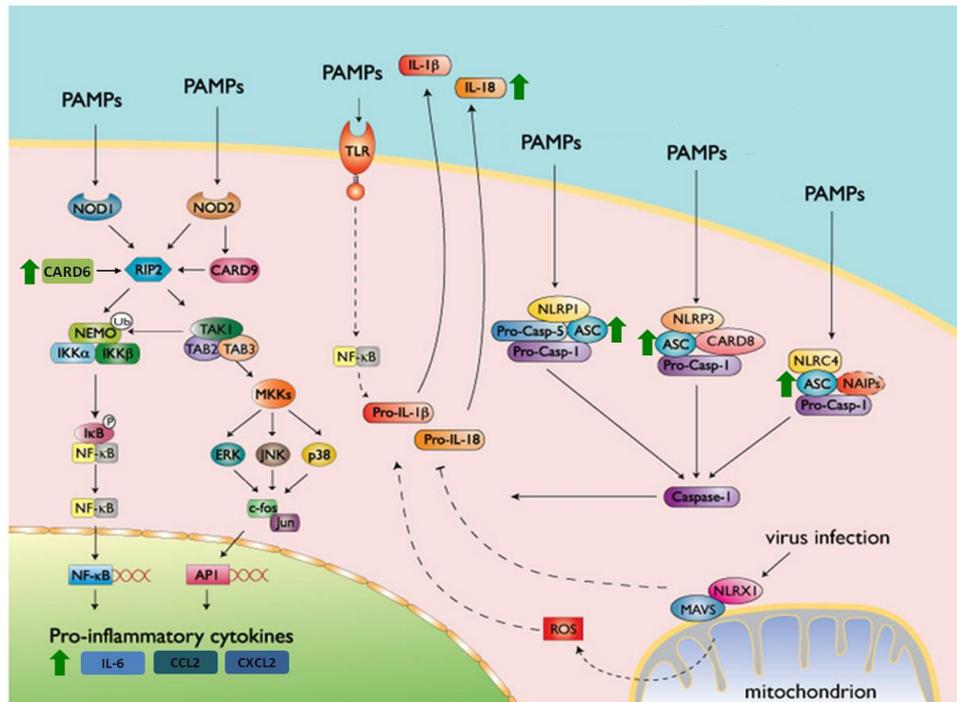


Figura 19. Vía de señalización por receptores tipo NOD. Imagen simplificada de la vía de señalización mediada por receptores tipo NOD. Se muestran los principales componentes y efectores así como los productos finales de la vía. Asimismo se marcan los genes afectados por la incubación con MVs con flechas verdes que indican sobre-expresión (Tomado y adaptado de <http://www.invivogen.com/review-nlr>).

Es razonable que en el contexto de la incubación con MVs, la célula sea capaz de percibir la presencia de moléculas ajenas en el citoplasma y por ende responder a estas señales, en este caso generando citoquinas e interleuquinas pro-inflamatorias.

A diferencia de lo que ocurre con los receptores tipo Toll (TLR), cuyo rol en el reconocimiento de *T. cruzi* es ampliamente aceptado y para los cuales se conocen los ligandos presentes en el parásito, la participación de los NLR en la infección por *T. cruzi* ha sido poco estudiada, y solo recientemente se han comenzado a describir algunos de los mecanismos involucrados [113]. Silva y colaboradores reportaron que tanto Nod1 como Nod2 (dos de los principales NLRs [114]) participan en la respuesta inmune innata frente a *T. cruzi*, ya que macrófagos de ratones deficientes en estos receptores ven afectada su capacidad de producir óxido nítrico, IL-12 y TNF- α . Asimismo, demostraron que la respuesta desencadenada por Nod1 es necesaria para la resistencia a la infección [115]. Más recientemente se vio que *T. cruzi* es capaz de activar el inflammasoma y consecuentemente inducir la producción de IL-1 β [116]. En este mismo trabajo, los autores reportan la sobre-expresión, entre otros, de IL-18, IL-6 y CCL2, los cuales también se ven sobre-expresados luego de la incubación con MVs.

Los ligandos de *T. cruzi* que desencadenan la activación de los NLR y su vía de señalización aun no han sido identificados. Dado que las MVs de *T. cruzi* contienen y/o transportan un subgrupo determinado de los PAMPs del parásito, los cuales parecen ser capaces de activar la vía de los NLR, el espectro de posibles ligandos responsables de la activación de la vía se ve reducido, lo cual contribuye y permite concentrar esfuerzos para la búsqueda de los mismos en el contexto de la infección.

La activación de la vía de los NLR como consecuencia de la incubación con MVs aporta evidencia a favor de que al menos parte de los componentes de estas son capaces de acceder al citoplasma, ya que es aquí donde se encuentran estos receptores. De este modo, si bien no es posible descartar efectos mediados por una interacción del tipo ligando-receptor en la superficie celular, sí podría decirse que existen efectos que se deben a la acción citoplasmática de las MVs o alguno de sus componentes.

4.3.2.3 Vía de señalización por IL-1

En estrecha relación con la vía de señalización por receptores tipo NOD, se encontró que a las 24 horas luego del tratamiento con MVs la vía de señalización mediada por IL-1 se encontraba alterada con respecto a las células no tratadas. La interacción de esta interleuquina con su receptor da lugar a una cascada de transducción de señales que estimula, a través de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, la producción de varias citoquinas pro-inflamatorias [117]. En la figura 20 se observa que tanto el receptor (IL-1R) como el co-receptor (IL-1R AP) de ambos tipos de IL-1 se encuentran sobre-expresados, así como lo está uno de los productos finales de la vía, la citoquina pro-inflamatoria CCL2. La activación aparente de esta vía es coherente con la activación de la vía de señalización mediada por receptores tipo NOD, y por lo tanto también con la detección de moléculas exógenas en el interior celular.

Es llamativo que no se haya detectado sobre-expresión de IL-1 a nivel de ARN mensajero (incluso con *fold change* menor a 3) en ninguno de los tiempos analizados. Sin embargo, cabe recordar que la activación de la vía de los NLR permite la activación de Caspasa 1, la cual se encarga de clivar la forma no madura de IL-1 β , para que sea liberada al medio extracelular [118], y no necesariamente tiene efectos directos sobre la expresión de esta interleuquina a nivel de ARN mensajero. Por otra parte, se conoce

el hecho de que otras interleuquinas de la familia de IL-1 son capaces de unirse a IL-1R y a IL-1R AP (ambos sobre-expresados luego de la incubación con MVs) y desencadenar la cascada de transducción de señales [117]. Entre estas interleuquinas se encuentra IL-18, la cual a diferencia de IL-1, sí se ve sobre-expresada luego del tratamiento con MVs, pudiendo actuar entonces como ligando, estimulando la cascada de señalización.

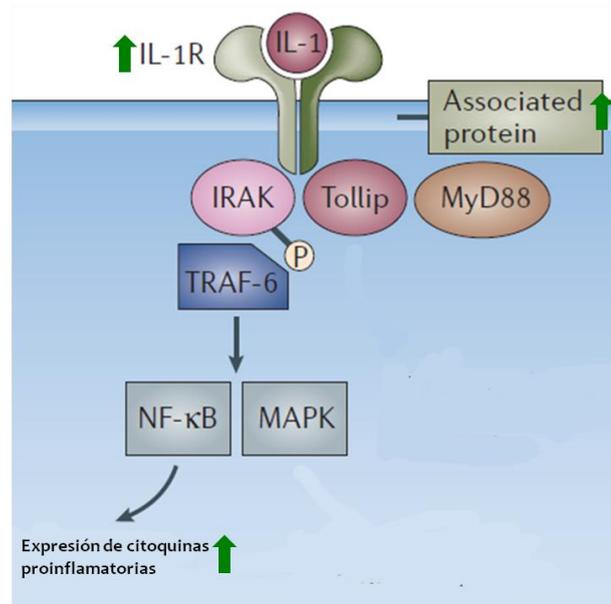


Figura 20. Vía de señalización por IL-1. Esquema de la vía de señalización de IL-1. Se presenta de forma simplificada cómo luego de la interacción entre IL-1, su receptor y proteínas asociadas tiene lugar una cascada de señalización que da lugar a la expresión de citoquinas proinflamatorias. También se marcan los genes afectados por la incubación con MVs con flechas verdes que indican sobre-expresión. (Tomado y adaptado de [119]).

4.3.2.4 Vía de señalización por Rho GTPasas y reordenamiento del citoesqueleto de actina

Las GTPasas de la familia Rho, son pequeñas proteínas capaces de unir e hidrolizar GTP, que se encuentran en todas las células eucariotas. Las Rho GTPasas coordinan y regulan todos aquellos aspectos relacionados al comportamiento, morfología y motilidad celular, a través de la re-organización del citoesqueleto, por ejemplo estimulando la polimerización de filamentos de actina [120]. Por su condición de GTPasas, las proteínas Rho alternan entre un estado activo, en el que unen GTP, y un estado inactivo, en el que se encuentran unidas a GDP. El cambio de un estado a otro es controlado por una serie de factores: los GEFs (del inglés, guanine nucleotide exchange factors) o factores de intercambio de nucleótidos de guanina, quienes permiten el intercambio de GDP por GTP, activando así a las proteínas Rho; las GAPs

(del inglés, GTPase activating proteins) o proteínas de activación de GTPasas, que realizan la acción opuesta, estimulando la conversión del GTP a GDP, manteniendo a las proteínas Rho en estado inactivo; y finalmente los inhibidores de disociación de nucleótidos de guanina (GDIs, guanine nucleotide dissociation inhibitors), quienes bloquean la liberación de GDP de las Rho GTPasas, manteniéndolas así inactivas [121].

La vía de señalización por Rho GTPasas fue detectada por la herramienta DAVID como una de las vías afectadas por el tratamiento con MVs tanto a las 6 como a las 24 horas (ver figura 21). Una proteína de esta familia, RhoV (implicada en la reorganización del citoesqueleto [122]), resultó estar sub-expresada. Asimismo, dos mensajeros que codifican para GEFs también se vieron disminuidos (si bien otros dos se encontraron sobre-expresados). Por su parte, dos mensajeros que codifican para GAPs, así como uno que codifica para un GDI se encontraron sobre-expresados. En conjunto estos resultados apuntan al mantenimiento de las Rho GTPasas en estado inactivo, y por ende a la inactivación de la vía de señalización mediada por estas proteínas. Es posible que la no activación de esta vía tenga consecuencias sobre el citoesqueleto y su ordenamiento. De hecho, la regulación del citoesqueleto de actina es una de las vías que parece verse afectada por el tratamiento con MVs, tanto a las 6 como a las 24 horas, de acuerdo al análisis hecho con el software GeneSpring (ver figura S3).

La regulación de las Rho GTPasas y su potencial efecto sobre el citoesqueleto de actina, puede ser relevante en el contexto de la entrada del parásito a la célula. El reordenamiento del citoesqueleto de actina ha sido reconocido como uno de los principales procesos que tiene lugar durante la entrada del parásito a la célula, donde la depolimerización de la actina favorecería el ingreso del parásito, mas no la retención de los mismos dentro de la célula [123-124]. En este contexto, la inactivación de las Rho GTPasas por parte de las MVs, evitando así la polimerización de la actina durante las primeras etapas de la interacción, podría facilitar el ingreso de los parásitos a la célula hospedera. Si se tiene en cuenta que durante el proceso de infección el ingreso de la mayor parte de los parásitos tiene lugar durante las primeras dos horas, es posible que el efecto que se observa aquí (luego de 6 horas) se trate de un efecto sostenido en el tiempo. Alternativa o complementariamente, la reorganización del citoesqueleto a un estado más laxo no a nivel de la membrana plasmática, sino en el

interior celular podría tener efectos positivos para la replicación y sobrevivencia del parásito dentro de la célula, así como en la fuga de los parásitos hacia el citosol desde la vacuola parasitófora.

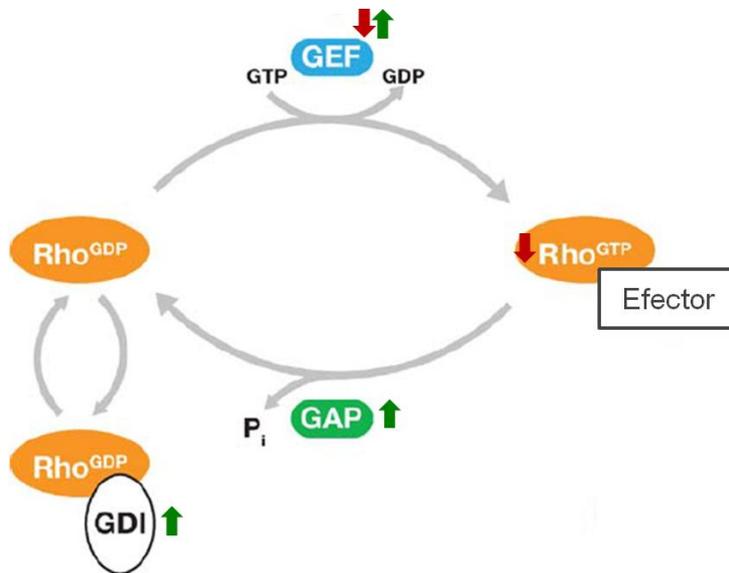


Figura 21. Esquema del ciclo de activación/inactivación de las Rho GTPasas. Se presenta de forma simplificada como los distintos reguladores (GEFs, GAPs y GDIs, descritos en el texto) permiten la alternancia entre el estado activo (o efector) o inactivo de las Rho GTPasas. Se marcan los genes afectados por la incubación con MVs con flechas verdes que indican sobre-expresión o rojas para sub-expresión. (Tomado y modificado de [121]).

Mott y colaboradores evaluaron el efecto de la infección de tripomastigotas y la exposición a componentes liberados por estos al medio de cultivo condicionado (MCC) sobre la mecánica celular, en términos de la remodelación y rigidez del citoesqueleto [125]. En este trabajo reportaron que la infección por tripomastigotas tiene un efecto pronunciado sobre la rigidez celular, la cual disminuye progresivamente al tiempo que tiene lugar el desensamblado de filamentos de actina. Los autores presentan además evidencias de que este efecto se debe a la inhibición de la vía de señalización de Rho y su quinasa, lo cual se encuentra en línea con los resultados obtenidos en este trabajo, y apoyaría un rol de las MVs en la facilitación de la infección. Sin embargo, el tratamiento con MCC da lugar a un aumento de la rigidez celular a causa de una mayor polimerización de la actina, en oposición a lo observado durante la infección y en parte a los resultados obtenidos aquí luego de la incubación con MVs. Estos resultados en principio contrastantes pueden deberse a múltiples causas. En este trabajo se

emplearon MVs purificadas de epimastigotas de la cepa Dm28c, obtenidas luego de someter a los parásitos a estrés nutricional por 48 hs. A diferencia de esto, Mott y colaboradores trabajaron con MCC de tripomastigotas de la cepa Y, obtenido luego de 14-18 horas, en el cual pueden encontrarse otros componentes además de las MVs, que de estar presentes, lo harían en menor concentración. Asimismo, los efectos del MCC son evaluados luego de 2 horas, mientras que los resultados obtenidos aquí corresponden a puntos posteriores en el tiempo (6 y 24 horas).

Es importante tener en cuenta que la inhibición de la señalización mediada por Rho GTPasas inferida se basa en el análisis de los niveles de expresión a nivel de ARNm y podría no verificarse a nivel de proteínas. Asimismo, los efectos que esta inhibición pueda tener sobre el citoesqueleto no fueron evaluados directamente y por tanto no es posible afirmar que la incubación con MVs tengan un efecto sobre este.

4.3.2.5 Metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs, del inglés matrix metalloproteinases) son consideradas las principales encargadas del remodelado de la matriz extracelular (MEC). Muchas otras moléculas que no pertenecen a la MEC son posibles sustratos de las MMPs, y los productos generados tienen efectos sobre procesos celulares como la migración, diferenciación, crecimiento y procesos inflamatorios [126].

Tanto la herramienta DAVID como el software GeneSpring identificaron que 24 horas luego del tratamiento con MVs, un miembro de las MMPs (MMP2) así como dos inhibidores de estas (TIMPs) se encontraban sobre-expresados (Figura 22). Dado que estos resultados apuntan en sentidos opuestos, no es posible inferir con facilidad si el tratamiento con MVs estimula o inhibe la acción de las MMPs.

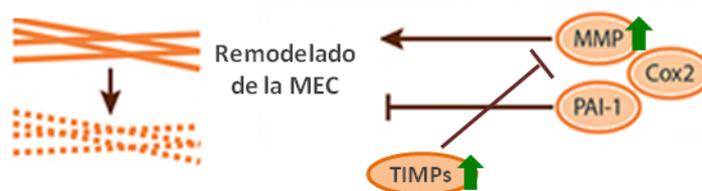


Figura 22. Diagrama de la acción de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) sobre la matriz extracelular (MEC). Se presenta de forma simplificada la actividad de remodelado de la MEC por parte de las MMPs, y la inhibición de las estas por TIMPs. Tanto estos últimos como las primeras se encontraron sobre-expresados por lo que se los marca con flechas verdes. (Tomado y adaptado de <http://www.horizondiscovery.com/pathway-models/angiogenesis.php>).

Durante el proceso de invasión el parásito secreta proteasas capaces de degradar la MEC, de forma de facilitar el ingreso a la célula [127-128]. Entre estas se encuentra la cruzipaína, la cual es transportada en MVs de *T. cruzi* [54]. Por otra parte, la inducción de la expresión de las MMPs 2 y 9 se ha visto en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi*, así como en vellosidades coriónicas [129-131], participando en estas últimas de los cambios que tienen lugar en la MEC, facilitando la infección. En este sentido, es posible que las MVs estimulen la expresión de MMP2 de forma de facilitar el remodelado de la MEC en conjunto con las proteasas (entre ellas cruzipaína) que son transportadas en las MVs, favoreciendo el proceso de invasión. Adicionalmente o de forma alternativa, las MMPs podrían jugar un papel en la respuesta inmune, ya sea facilitando la migración de células del sistema inmunitario o modificando la presencia de citoquinas y quimioquinas, como también se ha visto en lesiones asociadas a la cardiopatía chagásica [129, 132]. Gutierrez y colaboradores reportaron la sobre-expresión conjunta de MMPs y TIMPs luego de la infección por *T. cruzi* en células cardíacas y proponen que la estimulación de estos últimos favorecería la fibrosis durante el estadio crónico de la enfermedad [130]. Alternativamente, es posible que la expresión de los TIMPs en conjunto con MMPs represente un intento de la célula de contrarrestar los potenciales efectos de las MMPs.

Finalmente, es interesante notar que la expresión de MMP2 (el miembro de las MMPs que se vio sobre-expresado) es regulada positivamente por IL-1 y TGF- β (entre otros) [133]. Si bien la expresión de IL-1 no se vio alterada, la activación de la vía de NLR puede haber desencadenado su activación tal como fue discutido en la sección 4.3.2.3. Adicionalmente TGF- β presentó un *fold change* de 2.6 en el tiempo 1, con lo cual puede haber estimulado la expresión tanto de MMP2 como de alguno de sus inhibidores [133-134], independientemente de otros posibles efectos sobre la célula.

4.3.2.6 Vía de señalización de Wnt

Esta vía se identificó como afectada tanto a las 6 como a las 24 horas luego del tratamiento con MVs. La vía de señalización de Wnt es una vía de transducción de señales que se activa a partir de la unión de una proteína de la familia Wnt a un receptor de la familia Frizzled. Esta interacción estimula una serie de cascadas de transducción de señales entre las que se incluyen la vía canónica de Wnt/ β -catenina, y

dos vías no canónicas independientes de β -catenina: la vía de Wnt/ Ca^{2+} y la vía de polaridad celular plana (Planar Cell Polarity o PCP), con múltiples efectos sobre la célula [135-136].

La figura 23 representa un esquema de la vía de señalización de Wnt, sobre el cual se indican los genes que se vieron sub o sobre-expresados. En la misma puede verse que dos miembros de la familia de proteínas Wnt (WNT6 y WNT10A) se encuentran sub-expresados, al tiempo que se encuentra sobre-expresado un miembro de la familia Dkkopf, reguladores negativos de esta vía de señalización [137]. Asimismo, el factor de transcripción NFAT, un efector de la vía de Wnt/ Ca^{2+} [135] se encuentra sub-expresado. Esto indicaría que la vía de señalización mediada por proteínas de la familia Wnt se encuentra inactiva. Sin embargo, la Axina (Axin), una proteína que se une a β -catenina impidiendo así la activación de la vía [135], se encontró sub-expresada. En el mismo sentido, la proteína ICAT también se encontró sub-expresada. La misma tiene funciones inhibitorias de la vía de Wnt al interactuar con β -catenina interfiriendo en la unión de ésta a los factores de transcripción del tipo TCF, efectores de la vía de Wnt [138]. Adicionalmente, otro regulador negativo de la vía de Wnt/ β -catenina, NKD2 [139], también se encuentra sub-expresado. Finalmente, DAAM1, una proteína que participa en la activación de la vía de PCP mediante su interacción con una Rho GTPasa [135, 140], se encuentra sobre-expresada. Teniendo en cuenta que algunos reguladores negativos de la vía se encuentran reprimidos, que uno de los reguladores positivos se encuentra sobre-expresado, así como lo está WNT7B, los resultados apuntan a la activación de la vía de Wnt, en oposición a lo interpretado anteriormente.

Es posible que ciertas cascadas de señalización mediadas por Wnt se encuentren reprimidas mientras que otras no. Si bien algunas Wnt activan preferencialmente vías dependientes de β -catenina (ej: WNT1, WNT3A, WNT8) o vías independientes de β -catenina (ej: WNT5A, WNT11), la actividad de un ligando Wnt depende tanto del contexto celular como del receptor [141]. Ninguno de los tres miembros de la familia de Wnt que se encontraron modificados activa preferencialmente un tipo u otro de vía, por lo que no podemos inferir simplemente a partir de los niveles de expresión de estos cuál de las vías podría verse afectada. En principio, la información disponible no

parece ser suficiente para deducir claramente el estado de activación de las distintas vías.

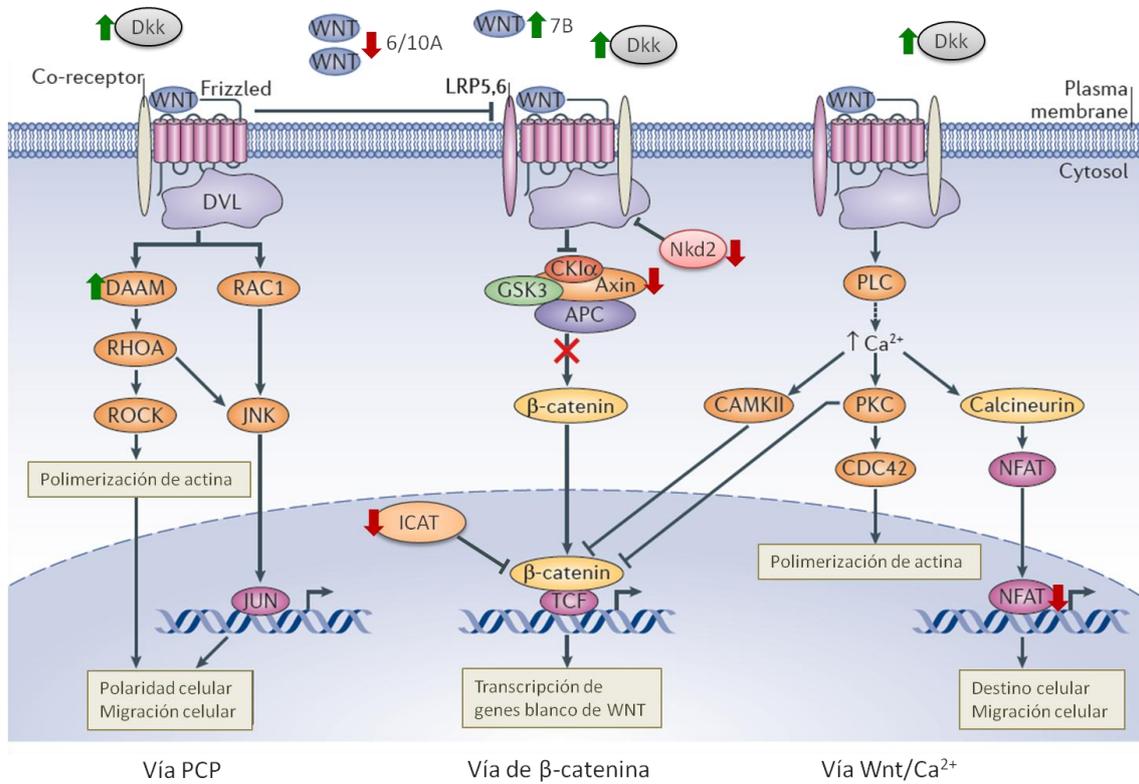


Figura 23. Esquema de las distintas vías señalización de Wnt. Se muestran las 3 vías más estudiadas de señalización medidas por Wnt. De izquierda a derecha se presentan la vía de polaridad celular plana (PCP), la vía canónica de β -catenina y la vía de Wnt/ Ca^{2+} , así como los principales efectos de la activación de cada vía. Se marcan con flechas rojas y verdes los genes sub o sobre-expresados respectivamente (Tomado y modificado de [142]).

La alteración de la/s vías de señalización de Wnt, más allá de si se trata de activación o inhibición, no parece *a priori* tener relación con el proceso de invasión o durante la infección, ya que típicamente se la asocia a fenómenos que tienen lugar durante el desarrollo y no es reportada en la literatura como una de las vías de señalización activadas durante la interacción célula hospedera-parásito. Su determinación como una de las vías afectadas por el tratamiento con MVs explica en parte algunos de los procesos biológicos identificados por el análisis de enriquecimiento de términos ontológicos tales como el desarrollo, su regulación y la diferenciación celular.

Las vías independientes de β -catenina regulan ciertos cambios celulares muy relacionados con los que se desencadenan luego del contacto inicial de la célula con el parásito. Por un lado, la activación de las dos vías no canónicas de Wnt/PCP y Wnt/ Ca^{2+}

tienen efectos sobre el citoesqueleto celular, estimulando la polimerización de la actina. El rol del citoesqueleto durante el ingreso del parásito a la célula fue discutido en la sección 4.3.2.4, donde se describió la posible inhibición de las Rho GTPasas y de la polimerización de actina luego del tratamiento con MVs. Otro escenario posible es que las MVs estimulen la vía de Wnt/ Ca^{2+} , movilizandando las reservas de Ca^{2+} intracelulares (Ca^{2+}_i). La interacción en la superficie celular con tripomastigotas da lugar a cascadas de señalización en la célula que llevan a un aumento en los niveles de Ca^{2+}_i , dependiente de fosfolipasa C e inositol trifosfato, necesario para la invasión exitosa [143]. Este evento es clave durante el ingreso del parásito a la célula ya que permite la fusión de los lisosomas con la membrana plasmática, y así el acceso de parásito a estos, desde los cuales posteriormente transitaran al citoplasma, en una de las principales (mas no única) vías de entrada a la célula [144].

Los datos obtenidos no apoyan preferencialmente la activación o inhibición de las vías no canónicas de Wnt. Sin embargo, tendría sentido que las MVs producidas por el parásito inhibieran aquellas vías que estimularan la polimerización de actina, en forma coordinada con la inhibición de las Rho GTPasas, así como también sería favorable para el mismo que las MVs generaran un aumento en los niveles de Ca^{2+}_i , generando un ambiente propicio para la invasión. Como fue mencionado, los resultados obtenidos no permiten concluir que sean estos los fenómenos que suceden luego del tratamiento con MVs, por lo que análisis dirigidos específicamente a la determinación del estado de activación de estas vías son necesarios para poder contrastar las hipótesis planteadas.

Finalmente, la vía de Wnt/ β -catenina ha sido implicada en la regulación de la respuesta inmune, siendo necesaria para la generación de linfocitos T de memoria [145], manteniendo un fenotipo tolerogénico en células dendríticas [146] y regulando la respuesta frente a ciertos patógenos, posiblemente a través de la generación de linfocitos T reguladores [147]. No es posible descartar que el tratamiento con MVs tenga un efecto sobre la vía de Wnt/ β -catenina, relacionada a la respuesta inmune, cuya repercusión no puede ser vislumbrada a partir de los elementos disponibles.

El análisis de la expresión génica de distintos tipos celulares infectados por *T. cruzi* ha sido llevado a cabo mediante microarreglos, con resultados muchas veces contrastantes. Los primeros ensayos de microarreglos llevados a cabo en fibroblastos humanos durante las primeras horas de la infección (2, 4, 6 y 24 horas) prácticamente no registraban cambios en la expresión génica [148]. Los autores de este trabajo proponían que esto se trataba de una estrategia del parásito de “pasar desapercibido” durante el ingreso. Más tarde, en fibroblastos murinos, luego de 5 días de infección, se reportó un perfil de expresión pro-apoptótico [149], mientras que en células HeLa 3 días post-infección se vio que la infección tenía un efecto anti proliferativo, inhibiendo la expresión de promotores de la proliferación y estimulando la de inhibidores de esta [150]. Posteriormente, los perfiles de expresión génica de distintos tipos celulares humanos, 24 horas post-infección, fueron analizados mediante microarreglos por Costales y colaboradores, y en combinación con ensayos de transwell se detectaron procesos dependientes o independientes de factores solubles que puedan ser generados por las propias células en respuesta a la infección, tales como citoquinas [151]. Los procesos independientes del efecto de las citoquinas liberadas, comunes a todos los tipos celulares estudiados, incluían el catabolismo de aminoácidos, la respuesta a heridas y el bloqueo de la progresión del ciclo celular. Finalmente y más recientemente, se analizaron los perfiles de expresión de cardiomiocitos murinos durante las primeras etapas de la infección (1, 2, 4, 6, y 12 horas), así como luego de transcurridas 24 y 48 horas. Contrario a reportes anteriores, los autores encontraron que en las etapas iniciales de la infección tiene lugar un gran cambio en la expresión génica global de las células, que afecta, entre otros, la respuesta inmune, inflamación, ciclo celular, apoptosis, respuestas a estrés, la homeostasis redox y la remodelación del citoesqueleto y la matriz extracelular [152]. Los resultados obtenidos por estos autores coinciden en varios puntos con los obtenidos en este trabajo. Por un lado, observan cambios en la expresión que dan lugar a la disrupción del citoesqueleto de actina, lo cual concuerda con lo observado aquí en relación a la inactivación de Rho GTPasas. Asimismo, y si bien no ven alterada la expresión de MMPs, sí observan que el remodelado de la matriz extracelular se ve afectado. Finalmente, también observan la inducción de la respuesta inmune a través de la estimulación de la expresión de genes involucrados en estas, tales como citoquinas proinflamatorias.

De todos modos, los resultados obtenidos por Costales y colaboradores [151] ponen de manifiesto la necesidad de considerar que los efectos observados luego de un tratamiento (independientemente de si se trata de la infección o de la incubación con MVs) pueden no deberse de forma directa al tratamiento realizado. Dado que las vías analizadas con mayor profundidad se encuentran muy relacionadas entre sí, es posible que parte de la respuesta observada se deba a efectos indirectos de las MVs, por lo que la identificación de un “responsable” en las mismas no siempre será posible.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección proveen de una idea global del efecto que las MVs pueden tener sobre la célula hospedera. Cabe destacar varios aspectos:

1. La incubación con MVs tiene un efecto sobre las células hospederas que decae en el tiempo. La mayor parte de los cambios observados tienen lugar a las 6 horas luego del tratamiento, manteniéndose afectados a las 72 horas sólo un 2.5% de los genes modificados inicialmente. En el contexto de la infección, puede suponerse que el contacto de las MVs con las células hospederas tendrá lugar previo y durante el contacto del propio parásito con estas. Ha sido reportado que luego de tan solo 10 minutos de incubación, es posible detectar parásitos internalizados las células hospederas, e independientemente de la vía de ingreso, todos los parásitos han alcanzado el compartimento lisosomal luego de 1 hora [144]. Por lo tanto, es posible que cambios (quizás más marcados) tengan lugar inclusive antes de las 6 horas, y debido al diseño experimental utilizado no fueron detectados. De todos modos, se ha reportado la liberación de MVs por parte del parásito una vez que este ya ha ingresado a la célula [54], por lo que podrían seguir teniendo efectos luego de las 72 horas.

Es importante mencionar que en los ensayos realizados en este trabajo no se incluyó un control de células no tratadas para cada tiempo evaluado, sino que se trabajó con un pool de células obtenidas a distintos tiempos. La inclusión de controles para cada tiempo no fue posible debido al costo que esto implica, pero podrían ser útiles para descartar cambios temporales que normalmente tienen lugar en las células.

2. El análisis de los resultados obtenidos a través del enriquecimiento de términos ontológicos para la detección de procesos biológicos afectados y a través de la

identificación de vías celulares afectadas permitió contar con un panorama general de lo que sucede en la célula en respuesta al tratamiento con MVs, a nivel de ARN mensajero. En términos generales, se observaron cambios que podrían favorecer el ingreso y el mantenimiento del parásito en la célula (modulación del citoesqueleto y remodelación de la MEC) y que podrían contribuir a la infección (inhibición del sistema del complemento y la coagulación). Sin embargo, las células hospederas no son indiferentes al estímulo “ajeno” que representan las MVs, por lo que también se detectan respuestas del tipo inmune y pro inflamatorias, que también pueden influir en el desarrollo de la infección.

Como fue mencionado anteriormente, solo ciertas vías fueron analizadas en mayor profundidad, por lo que aun restan vías que pueden resultar interesantes para examinar con más detalle, teniendo en cuenta tanto el análisis de enriquecimiento de términos ontológicos como la información disponible en la literatura. Uno de estos casos es el de la angiogénesis, un proceso que se identificó como afectado por el tratamiento con MVs tanto por el análisis ontológico como por el de vías. Si bien no puede en principio establecerse una relación evidente entre este proceso y la infección, podría tratarse de un efecto colateral, teniendo en cuenta que se han reportado en la literatura efectos anti-angiogénicos de la calreticulina de *T. cruzi* [153-154], nombrada anteriormente y transportada en las MVs. Otro ejemplo, quizás más interesante, es el del metabolismo lipídico. Este proceso fue identificado a través del análisis ontológico, junto con otros procesos relacionados tales como el transporte de lípidos y el metabolismo de hormonas lipídicas. Asimismo, las vías de señalización de SERBP (con funciones regulatorias sobre el metabolismo lipídico [155]), la de receptores nucleares en el metabolismo lipídico, el metabolismo de la vitamina A y carotenoides y la adipogénesis también se detectaron como afectadas por el tratamiento con MVs. En relación a los receptores nucleares, se detectaron afectados un tipo de receptores denominados PPARs (del inglés, peroxisome proliferator-activated receptors), involucrados no solo en la regulación del metabolismo de lípidos sino también en la respuesta inflamatoria [156-157]. Recientemente ha sido demostrado que entre las 18-24 horas luego del ingreso del parásito a la célula hospedera, estas comienzan a producir energía no a partir de glucosa, sino preferentemente a partir de ácidos grasos, lo cual es beneficioso para el parásito [158].

Es tentador especular que las MVs tendrán un efecto sobre el metabolismo lipídico que contribuya a un ambiente celular favorable para la replicación del parásito.

Estos dos ejemplos indican que es posible continuar profundizando en el análisis de los resultados. Asimismo, otras estrategias de análisis de los datos pueden ser empleadas. Diferentes criterios fueron empleados a lo largo de este trabajo para la selección tanto de los genes a analizar como de los procesos biológicos y vías. Otros criterios igualmente válidos podrían emplearse, y si bien es posible que los aspectos generales no se vean modificados, quizás se obtengan evidencias adicionales que apoyen algunos de los resultados obtenidos, o permitan resolver ciertas ambigüedades en algunos de estos. Adicionalmente, podrían detectarse procesos que durante el análisis fueron descartados por las restricciones impuestas al mismo.

3. Para el análisis de los efectos de las MVs sobre la célula hospedera, se consideraron como células control aquellas que no fueron incubadas con estas. Esto si bien presenta el beneficio de poder observar efectos generales del tratamiento con MVs, no permite discernir cuáles se deben específicamente a las MVs de *T. cruzi* y sus componentes, y cuáles simplemente se deben, por ejemplo, a la internalización de una vesícula lipídica por mecanismos como la endocitosis. En este sentido, podría ser útil incluir como control células tratadas con liposomas artificiales, que representen el estímulo endocítico, y permitan descartar cambios inespecíficos. Adicionalmente, la estrategia empleada en este trabajo no permite distinguir entre efectos generados por la fracción proteica, lipídica, de ácidos nucleicos y otras posibles moléculas presentes en las MVs. Puede considerarse que es esto lo que efectivamente tiene lugar durante la infección, y que de esta manera además se reproducen los posibles efectos sinérgicos que existan entre los distintos componentes. El estudio de los efectos de ciertos componentes de interés se realizó de forma individual, y se presenta y discute en la siguiente sección.

4. Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos reflejan los cambios que tienen lugar a nivel de ARN mensajero, y dada la complejidad de la regulación de la expresión génica en células eucariotas, no necesariamente se verán plasmados a nivel de proteínas. Si bien esto no resta valor a los resultados obtenidos, es un aspecto

a considerar a la hora de afirmar la existencia de efectos a causa del tratamiento. Aquellos procesos que resulten de particular interés deberán evaluarse de forma directa y específica para verificar las conclusiones inferidas.

4.4 Transfección de células HeLa con tsRNAs presentes en las MVs de *T. cruzi*: ensayos de viabilidad y análisis de microarreglos

Como fue mencionado anteriormente, las MVs de *T. cruzi* transportan entre otros componentes, dos tsRNAs, derivados de los ARNs de transferencia de Leucina y Treonina (tsRNA-Leu y tsRNA-Thr respectivamente), que en conjunto dan cuenta del 60% de los tsRNAs transportados por las MVs. Para evaluar el posible efecto de estos tsRNAs sobre la célula hospedera, se transfectaron células HeLa con oligoribonucleótidos sintéticos con la secuencia de los tsRNAs y se analizó su viabilidad así como su perfil de expresión génica a nivel de ARN mensajero por ensayos de microarreglos.

4.4.1 Eficiencia de transfección y viabilidad

La figura 24 muestra imágenes representativas de las distintas transfecciones llevadas a cabo (detalladas en la sección Materiales y Métodos), donde se puede observar que se logró una buena eficiencia de transfección (> 85% de células transfectadas) con las distintas sondas utilizadas. Asimismo, no se observan alteraciones fenotípicas evidentes, tanto en células tratadas únicamente con el agente de transfección como en las células transfectadas con los distintos oligoribonucleótidos sintéticos.

En cuanto a los ensayos de viabilidad, los mismos muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas (determinadas mediante ANOVA, p-valor ≥ 0.05) entre la viabilidad de las células control, las células tratadas solo con Lipofectamina y las células transfectadas con cualquiera de los oligoribonucleótidos utilizados (figura 25). Estos resultados indican que la transfección y las condiciones en que ésta se llevó a cabo no tienen efectos nocivos sobre la viabilidad de las células o su capacidad proliferativa.

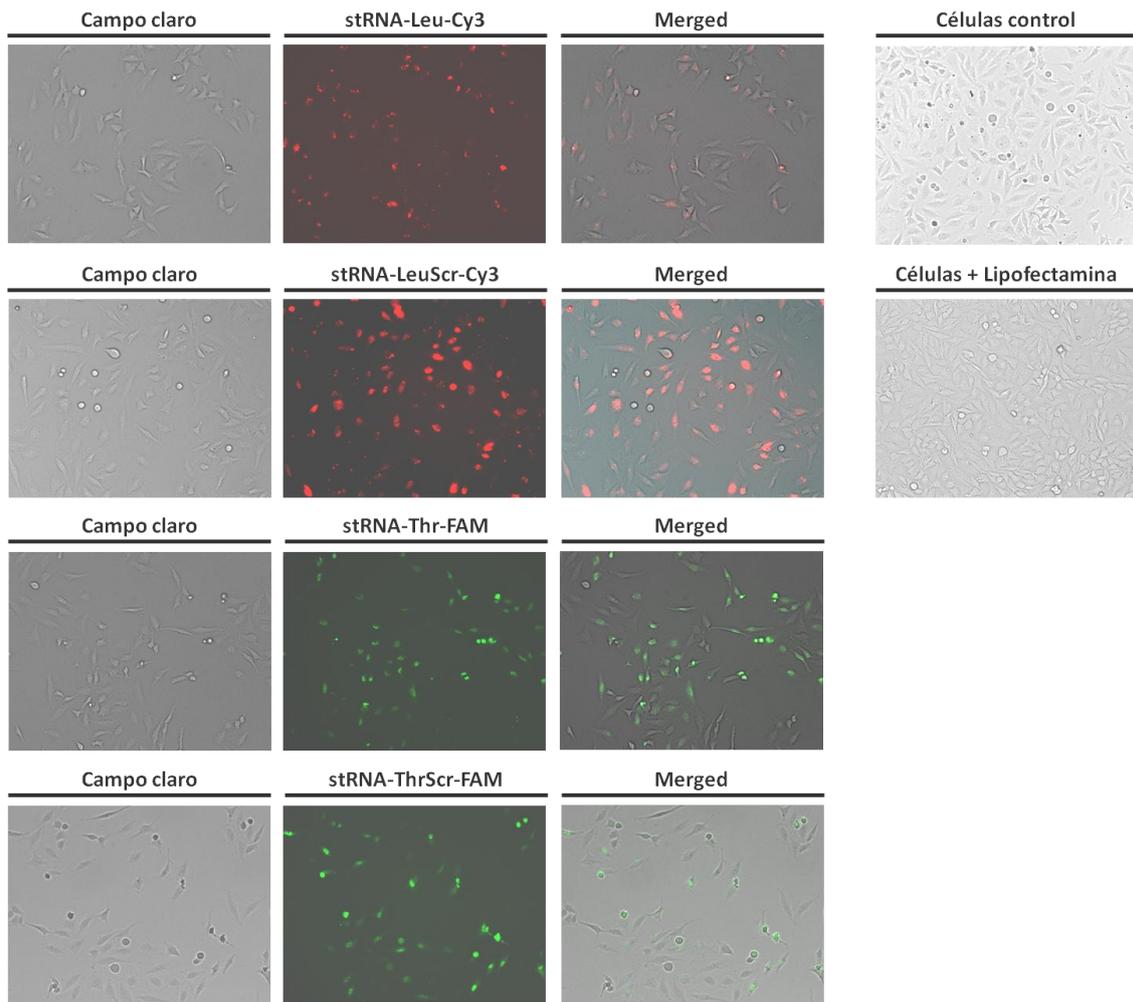


Figura 24. Transfecciones de células HeLa con los oligoribonucleótidos sintéticos tsRNA-Leu y tsRNA-Thr. Se presentan imágenes representativas del campo claro, la señal de la sonda y la imagen superpuesta de células transfectadas. A la derecha se muestran imágenes de campo claro de células sin ningún tratamiento y células tratadas únicamente con Lipofectamina. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 20X.

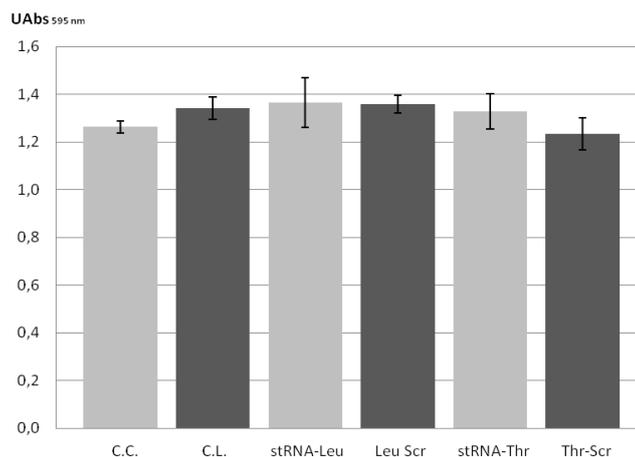


Figura 25. Análisis de la viabilidad de células transfectadas mediante tinción con cristal violeta. Se presentan las medidas de absorbancia a 595 nm y el desvío estándar para cada condición analizada: C.C.: células control, C.L.: células tratadas con lipofectamina, tsRNA-Leu o tsRNA-Thr: células transfectadas con el oligoribonucleótido correspondiente a los tsRNAs de interés, Leu-Scr o Thr-Scr: células transfectadas con los oligoribonucleótidos irrelevantes. No se observan diferencias significativas en la viabilidad celular como consecuencia de la transfección en ninguno de los casos. N=8

4.4.2 Análisis de expresión génica por microarreglos

A partir del ARN obtenido de las células transfectadas, se realizaron ensayos de microarreglos, con el fin de detectar posibles blancos de los tsRNAs más abundantes en las MVs de *T. cruzi*. Para determinar cuáles genes se veían afectados específicamente por los tsRNAs de interés y no simplemente debido a la exposición y el ingreso de ARN exógeno, se comparó en primer lugar las células transfectadas con los oligoribonucleótidos irrelevantes vs células tratadas con lipofectamina, y se identificaron los genes diferencialmente expresados (p -valor $\leq 0,05$). El mismo análisis fue realizado para las células transfectadas con las sondas de interés. Finalmente, mediante sustracción se determinaron cuales eran los genes modificados de forma específica por los tsRNAs-Leu o tsRNA-Thr. Estos genes fueron luego filtrados por *fold change*, donde se seleccionaron aquellos que tuvieran un $FC \geq 3$.

La transfección con el tsRNA Leu modifica la expresión de 3 genes, en todos los casos causando su sobre-expresión. Por su parte, el tsRNA Thr, modificó 20 genes. De estos, la mitad se vio sub-expresado, y la otra mitad sobre-expresados. La lista completa de estos genes y los valores de *fold change* registrados se presentan en la tabla 6. Dado el bajo número de genes el análisis de vías no genera resultados con suficiente apoyo estadístico, es decir, no es posible asignar estos genes a ninguna vía en particular. Sin embargo, los 20 genes modificados por tsRNA-Thr tras el análisis de enriquecimiento de términos ontológicos fueron asociados a la regulación de procesos metabólicos, a través de la herramienta *Functional Annotation Clustering* de la plataforma DAVID, con un *enrichment score* de 1,2 (equivalente a un p -valor de 0.08).

Posteriormente se realizó la comparación con los genes que se vieron modificados luego del tratamiento con MVs. Se encontró que de los tres genes modificados por la transfección con el tsRNA Leu, ninguno se veía afectado por la incubación con MVs en ninguno de los tiempos analizados, independientemente del *fold change*. Por su parte, cinco genes modificados por la transfección con tsRNA Thr también se identificaron como alterados por el tratamiento con MVs. Estos genes (HPGD, HOOK1, ATF3, CXCL2 y DUSP6) se encuentran destacados en la tabla 6, en la que también se detalla en qué tiempo y con que *fold change* se vieron modificados por las MVs.

Dos de estos genes (HPGD y HOOK1) mostraron cambios en direcciones opuestas en los distintos tratamientos (transfección o incubación con MVs). Dado que estos cambios no fueron verificados, no es posible descartar que se trate de un artefacto de la técnica de microarreglos. Alternativamente, es posible que la entrada del tsRNA aislado del resto de los componentes de las MVs tenga un efecto diferente al que tiene al ingresar junto con el resto de los componentes. De la misma manera, la detección de cambios generados por los tsRNAs que no se observan con las MVs puede indicar que ciertos componentes de las MVs contrarrestan o enmascaran los efectos de los tsRNAs, lo cual sea quizás más representativo de lo que ocurre realmente. En este sentido es necesario también considerar que las concentraciones de tsRNAs empleadas aquí no necesariamente sean similares a las que se dan dentro de las MVs y/o dentro de las células luego del ingreso de estas. Finalmente, es necesario tener en cuenta que el mecanismo de ingreso de los tsRNAs no es el mismo cuando se da mediante MVs o gracias a un agente de transfección, y por lo tanto el destino y el acceso a distintas maquinarias celulares puede variar en cada caso, lo cual también puede dar cuenta de diferencias observadas.

En cuanto a los otros tres genes alterados (ATF3, CXCL2 y DUSP6), los mismos se encontraron sobre-expresados luego de ambos tratamientos. En dos de ellos (CXCL2 y DUSP6) además se verifica que el cambio es más pronunciado a las 24 horas luego de la incubación con MVs, coincidiendo con el tiempo en que se analizó la expresión luego de la transfección (ver tabla 6). A continuación se detalla brevemente la función de cada uno de ellos.

ATF3 es un factor de transcripción dependiente de AMP cíclico y es miembro de la familia CREB (del inglés cyclic AMP response element-binding o proteínas de unión a elementos que responden a AMPc). La expresión de ATF3 se ve inducida a partir de señales de estrés tales como citoquinas, infección bacteriana y falta de nutrientes. Este factor de transcripción es capaz tanto de activar como reprimir la transcripción dependiendo del contexto celular, así como del promotor y de la interacción con otros factores. Tiene funciones de regulación de los mecanismos de defensa celulares, participando en la respuesta inmune contra patógenos [159-160]. CXCL2, también denominado MIP-2 α (del inglés macrophage inflammatory protein 2-alpha), es un miembro de la familia CXC de quimioquinas, reconocidas como importantes

mediadores en los procesos de inflamación. En particular, CXCL2 (que puede ser inducida por lipopolisacárido), actúa como un potente quimio-atrayente de neutrófilos [161-162]. El análisis de estos dos genes a través de la plataforma GeneMania (<http://genemania.org/>) indica que existe evidencia de co-expresión entre estos dos genes, consistente con el rol que ambos tienen en la respuesta inmune.

Finalmente, DUSP6 es un miembro de la familia de fosfatasas de especificidad dual, capaces de desfosforilar residuos de fosfotirosina así como de fosfoserina/fosfotreonina en un mismo sustrato. Existen varios subgrupos dentro de esta familia de fosfatasas. En particular, DUSP6 pertenece al grupo de fosfatasas de MAPK (fosfatasas de quinasas activadas por mitógenos) o MKPs. Dentro de este subgrupo se distinguen a su vez, tres clases de MPKs, dependiendo del tipo de MAPK que tienen como sustrato, su localización subcelular y homología de secuencia. DUSP6 forma parte de las MKPs citosólicas, con especificidad por quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs, del inglés extracellular-signal regulated kinases). Dado que la actividad de las MAPK requiere que las mismas se encuentren fosforiladas, la acción de las MPKs es de inhibición de estas, y por ende de sus cascadas de señalización, las cuales están involucradas en la regulación de diversos procesos celulares tales como la adhesión, crecimiento y proliferación, diferenciación, regulación del citoesqueleto y sobrevivencia. Además de la regulación de las MAPKs mediante desfosforilación, DUSP6 puede actuar como un ancla para las mismas, determinando su localización subcelular. Por otra parte, DUSP6 se ha visto implicada en la regulación positiva de la expresión de genes de la gluconeogénesis, para lo cual tendría una acción independiente de la relacionada a la inactivación de MAPKs, actuando sobre el factor de transcripción FOXO1 [163-165].

Tanto ATF3 como DUSP6 tienen funciones regulatorias, pudiendo afectar una amplia variedad de procesos y vías celulares en diversos sentidos. Debido a esto, la sobreexpresión de estos genes no tiene un efecto que pueda inferirse sencillamente y por tanto no es posible predecir o vislumbrar una función o rol del tsRNA-Thr en la célula hospedera y en el contexto de la interacción de esta con el parásito.

Tabla 6. Genes modificados por la transfección con tsRNAs. Se presentan los genes diferencialmente expresados 24 horas luego de la transfección con tsRNA-Thr y tsRNA-Leu. Procesos ($p < 0.05$, $fold\ change \geq 3$). Se indica el símbolo y nombre del gen así como el $fold\ change$ que presentó. En las dos últimas columnas se detalla si el gen se vio modificado o no (“NO”) luego de la incubación con MVs con un $fold\ change$ de 3 o más (“MVs ($p \leq 0.05$, $FC \geq 3$)”) y sin discriminar por $fold\ change$ (“MVs ($p \leq 0.05$)”). Cuando corresponde se indica en que tiempo se detecto la modificación (6, 24 o 72 horas post-incubación) y la magnitud del cambio (“FC”). Asimismo, los genes que se encontraron afectados tanto por la transfección con tsRNA como por la incubación con MVs se resaltan .

Gen		Fold Change	MVs ($p \leq 0.05$, $FC \geq 3$)	MVs ($p \leq 0.05$)
tsRNA-Thr ($p \leq 0.05$, $FC \geq 3$)				
BRWD1	Bromodomain and WD repeat domain containing 1	-4,68	NO	NO
VPS8	Vacuolar protein sorting 8 homolog (S. Cerevisiae)	-3,98	NO	NO
MFSD8	Major facilitator superfamily domain containing 8	-3,65	NO	NO
SRRM4	Serine/arginine repetitive matrix 4	-3,50	NO	NO
LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2	-3,48	NO	NO
HPGD	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	-3,38	24 hs FC: 3,7	6 hs FC:1,8
RSF1	Remodeling and spacing factor 1	-3,26	NO	NO
MLLT10	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to 10	-3,07	NO	NO
HOOK1	Hook homolog 1 (Drosophila)	-3,07	6 hs FC: 3,5 24 hs FC: 4,5	72 hs FC: 1,7
RMND5A	Required for meiotic nuclear division 5 homolog A (S. Cerevisiae)	-3,06	NO	NO
TRIB1	Tribbles homolog 1 (Drosophila)	3,04	NO	NO
EGR1	Early growth response 1	3,05	NO	NO
ATF3	Activating transcription factor 3	3,28	NO	6hs FC:-1,9 24 hs FC: 1,2 72 hs FC:-1,7
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	3,410	NO	NO
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	3,501	NO	NO
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3,66	24 hs FC: 3,2	6hs FC:1,2 72 hs FC:1,9
LOC100293390	Hypothetical protein LOC100293390	3,826	NO	NO
GBP5	Guanylate binding protein 5	3,83	NO	NO
DUSP6	Dual specificity phosphatase 6	4,084	24 hs FC: 2,9 72 hs: FC: 3	6 hs FC: -1,2
EGR2	Early growth response 2	4,16	NO	NO
tsRNA-Leu ($p \leq 0.05$, $FC \geq 3$)				
CPNE4	Copine IV	3,00	NO	NO
SPRY4	Sprouty homolog 4 (Drosophila)	3,29	NO	NO
GTF2A1	General transcription factor IIA	3,36	NO	NO

El mecanismo de acción de los tsRNAs no se encuentra dilucidado por completo, a pesar de ciertas evidencias que apuntan a su capacidad de regular la expresión génica a través de mecanismos que podrían involucrar la degradación específica de ciertos ARNs mensajeros o la inhibición del inicio de la traducción [79, 81, 83]. Sin embargo, los resultados obtenidos aquí muestran que la acción de los tsRNAs no siempre da lugar a sub-expresión. Dado que el análisis de expresión génica se llevo a cabo 24 horas luego de la transfección, es posible que los efectos de inducción de la expresión sean consecuencia del efecto directo de los tsRNAs sobre otros blancos. El análisis de la expresión génica en las primeras horas luego de la transfección podría aportar evidencia en este sentido, además de contribuir a la identificación de los blancos directos de estos pequeños ARNs. Alternativamente, es posible que el tsRNA se una por homología de secuencia con su ARN mensajero blanco induciendo su sobre-expresión, en una forma similar a lo reportado para ciertos microARNs bajo ciertas condiciones celulares [166]. En este sentido, la búsqueda bioinformática de posibles sitios de unión del tsRNA en el ARN mensajero (incluyendo las regiones 5' y 3' UTR) es una aproximación posible para el entendimiento del mecanismo de acción. Análisis bioinformáticos preliminares muestran que la interacción entre el tsRNA-Thr y 3 de los transcriptos afectados (ATF3, CXCL2 y DUSP6) es posible del punto de vista molecular y energético. Estos análisis acompañados de ensayos reporteros serían necesarios para validar la hipótesis de un mecanismo de acción que involucre apareamiento de secuencias. Finalmente, es también posible que el mecanismo de acción de los tsRNAs no implique efectos detectables a nivel de ARN, y por lo tanto para poder observarlos sean necesarias, por ejemplo, aproximaciones proteómicas que permitan ver si existe un efecto a nivel de proteínas, consistente con su acción a nivel de la inhibición del inicio de la traducción.

Por último, cabe mencionar que la elección de los tsRNAs que fueron empleados para las transfecciones se hizo teniendo en cuenta que estos son los más representados dentro de las MVs. Si bien consideramos que este es un criterio válido, no podemos descartar que otros pequeños ARNs puedan tener efectos (quizás más trascendentes) a pesar de encontrarse en menores cantidades. En este sentido, puede

resultar de interés el análisis de los cambios en el perfil de expresión génica de células enfrentadas al conjunto de pequeños ARNs contenidos en las MVs.

4.5 Validación de los resultados de microarreglos mediante RT-PCR en tiempo real (qPCR).

Con el fin de validar los resultados obtenidos por microarreglos se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Se seleccionaron aquellos genes que se vieron modificados por los dos tratamientos realizados en este trabajo: incubación con MVs y transfección con tsRNAs. Los resultados obtenidos se presentan gráficamente en la figura 26, en la cual se indica, para cada gen, el *fold change* con respecto a las células control para cada condición. Los mismos muestran que únicamente CXCL2 presenta los cambios esperados en todas las condiciones analizadas, es decir, se ve sobreexpresado 24 horas luego del tratamiento con MVs y luego de la transfección con el tsRNA-Thr, pero no con su contraparte irrelevante. Por su parte, ATF3 mostró sobreexpresión luego de la transfección con el tsRNA-Thr, pero también se vio afectado por la transfección con la correspondiente sonda “scrambled”, al tiempo que no se vieron cambios 24 horas post-incubación. Por último, DUSP6 no presenta un comportamiento esperado, ya que ninguno de los tratamientos muestra diferencias con respecto al control.

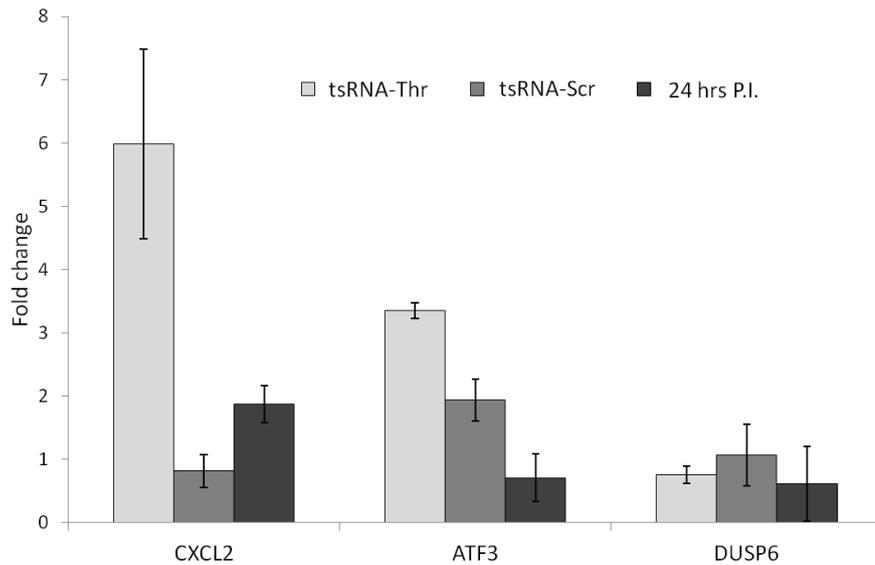


Figura 26. Resultado de los ensayos de PCR en tiempo real para los genes seleccionados. El gráfico muestra el *fold change* con respecto a las células control para cada condición (células tratadas únicamente con lipofectamina para las condiciones que implican transfección o células tratadas con medio sin MVs de *T. cruzi*), determinado mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para los genes analizados (CXCL2, ATF3 y DUSP6). Las barras de error representan el desvío estándar correspondientes a tres réplicas biológicas para cada condición, realizadas por duplicado. tsRNA-Thr: células transfectadas con el oligoribonucleótido sintético tsRNA-Thr; tsRNA-Scr: células transfectadas con la contraparte irrelevante de tsRNA-Thr; 24 hs P.I.: células 24 horas post-incubación con MVs.

Si bien es positivo que al menos 1 de los 3 genes evaluados haya podido ser validado, los resultados presentados en esta sección no representan un apoyo suficiente a los obtenidos en los ensayos de microarreglos. Esto no implica que estos últimos deban ser descartados, sino que para poder validarlos se requiere mayor estudio. En particular, en lo que concierne a los procesos biológicos afectados por el tratamiento con MVs, sería especialmente útil analizar en detalle aquellos genes que resulten claves en las vías celulares de interés y/o aquellos que hayan mostrado cambios muy pronunciados.

De todos modos, la sobre-expresión del ARN mensajero de CXCL2 pudo ser verificada por qPCR, lo cual aporta evidencias a favor de que los pequeños ARNs derivados de tRNAs son capaces de modular la expresión génica. Esto no implica necesariamente que las moléculas de tsRNA-Thr transportadas en las MVs sean las únicas responsables de la sobre-expresión de este gen, pero sí que son capaces de hacerlo. Estudios adicionales deberán llevarse a cabo para verificar si el cambio observado en los niveles de expresión responde a la interacción directa entre el tsRNA

y el ARN mensajero o si se trata de un efecto “secundario”, mediado por elementos de la propia célula.

5. Conclusiones y perspectivas

El presente trabajo buscó evaluar los efectos que tienen las MVs generadas y liberadas por el parásito *T. cruzi* sobre su célula hospedera, y así contribuir al entendimiento de las interacciones que tienen lugar durante la infección.

Inicialmente se llevó a cabo la tarea de optimizar las condiciones del tratamiento de las células con las MVs del parásito, en términos de la cantidad de MVs y la duración de la incubación.

Una vez puestas a punto estas condiciones, se analizó la posibilidad de que las MVs ingresaran a la célula mediante la vía endocítica, y se vio que es posible que estas exploten esta vía para internalizarse, si bien no se descartan otras alternativas.

Por otra parte se estudiaron los cambios que tienen lugar a nivel del transcriptoma de la célula hospedera cuando es incubada con MVs. Se detectó que el tratamiento implica importantes cambios en el perfil de expresión génica celular, el cual es más pronunciado durante las primeras horas luego de la incubación, decayendo en magnitud con el tiempo. Una variedad de procesos celulares parecen verse afectados, observándose respuestas que podrían favorecer una eventual infección, así como respuestas que apuntan hacia la protección de las células hospederas.

Finalmente, se evaluó el rol de ciertos tsRNAs transportados en las MVs, de interés por tratarse de los pequeños ARNs mayoritarios en un organismo que carece de las vías clásicas de regulación mediada por pequeños ARNs. Si bien los resultados obtenidos no permiten determinar de forma concluyente el rol de estos pequeños ARNs, sí es posible afirmar que son capaces de regular la expresión de ciertos genes en las células hospederas. El mecanismo por el cual son capaces de tal efecto no ha sido determinado aún.

Dado que sólo se evaluó una posible vía de entrada de las MVs, sería de interés el análisis de otras vías alternativas, así como la determinación del destino intracelular de los distintos tipos de componentes transportados por las mismas.

Será necesario realizar otros estudios para poder afirmar que los procesos que las MVs parecen afectar, efectivamente se ven afectados, especialmente considerando que se evaluaron cambios a nivel de ARN mensajero que pueden no verse reflejados a

nivel de proteínas. Asimismo, la identificación de cuáles de los componentes de los transportados por las MVs son responsables de los cambios observados puede ser de interés, en particular para la búsqueda de blancos terapéuticos. Por otra parte, el análisis de los resultados obtenidos aquí mediante microarreglos puede continuarse, concentrándose en ciertos procesos particulares que puedan resultar de interés.

Finalmente, es importante mencionar que en este trabajo se abordó el estudio de los efectos de las MVs sobre las células hospederas. Sin embargo, resultados del laboratorio de Genómica Funcional indican que las mismas tendrían efectos también sobre otros parásitos, induciendo en estos transiciones en el ciclo de vida, más concretamente la transformación al estadio infectivo. Sería de interés poder evaluar cuáles son los cambios que tienen lugar en el parásito, lo cual contribuiría al conocimiento de la biología general del mismo, y por ende a la comprensión de un proceso complejo como es el de la infección.

6. Referencias bibliográficas

1. Ruch, R.J., *Intercellular communication, homeostasis, and toxicology*. Toxicol Sci, 2002. 68(2): p. 265-6.
2. Hooshangi, S. and Bentley, W.E., *From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications*. Curr Opin Biotechnol, 2008. 19(6): p. 550-5.
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. 2007, Garland Science.
4. Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., and Buzas, E.I., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci, 2011. 68(16): p. 2667-88.
5. Harding, C.V., Heuser, J.E., and Stahl, P.D., *Exosomes: looking back three decades and into the future*. J Cell Biol, 2013. 200(4): p. 367-71.
6. Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J., *Shedding microvesicles: artefacts no more*. Trends Cell Biol, 2009. 19(2): p. 43-51.
7. Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., and Conrad, R., *Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*. Biochim Biophys Acta, 2012. 1820(7): p. 940-8.
8. Mittelbrunn, M. and Sanchez-Madrid, F., *Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(5): p. 328-35.
9. Raposo, G. and Stoorvogel, W., *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. 200(4): p. 373-83.
10. Shifrin, D.A., Jr., Demory Beckler, M., Coffey, R.J., and Tyska, M.J., *Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning*. Mol Biol Cell, 2013. 24(9): p. 1253-9.
11. Cocucci, E. and Meldolesi, J., *Ectosomes*. Current Biology, 2011. 21(23): p. R940-R941.
12. van Doormaal, F.F., Kleinjan, A., Di Nisio, M., Buller, H.R., and Nieuwland, R., *Cell-derived microvesicles and cancer*. Neth J Med, 2009. 67(7): p. 266-73.
13. Batista, B.S., Eng, W.S., Pilobello, K.T., Hendricks-Munoz, K.D., and Mahal, L.K., *Identification of a conserved glycan signature for microvesicles*. J Proteome Res, 2011. 10(10): p. 4624-33.
14. Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. 9(6): p. 654-9.
15. Bellingham, S.A., Coleman, B.M., and Hill, A.F., *Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(21): p. 10937-49.
16. Nolte-'t Hoen, E.N., Buermans, H.P., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H., and t Hoen, P.A., *Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(18): p. 9272-85.
17. Gibbings, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., and Voinnet, O., *Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity*. Nat Cell Biol, 2009. 11(9): p. 1143-9.
18. Wysoczynski, M. and Ratajczak, M.Z., *Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors*. Int J Cancer, 2009. 125(7): p. 1595-603.

19. Antonyak, M.A., Li, B., Boroughs, L.K., Johnson, J.L., Druso, J.E., Bryant, K.L., Holowka, D.A., and Cerione, R.A., *Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(12): p. 4852-7.
20. Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., Garcia-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B.A., Callahan, M.K., Yuan, J., Martins, V.R., Skog, J., Kaplan, R.N., Brady, M.S., Wolchok, J.D., Chapman, P.B., Kang, Y., Bromberg, J., and Lyden, D., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET*. Nat Med, 2012. 18(6): p. 883-91.
21. Nieuwland, R. and Sturk, A., *Why do cells release vesicles?* Thromb Res, 2010. 125 Suppl 1: p. S49-51.
22. Deatherage, B.L. and Cookson, B.T., *Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life*. Infect Immun, 2012. 80(6): p. 1948-57.
23. Deolindo, P., Evans-Osses, I., and Ramirez, M.I., *Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication*. Biochem Soc Trans, 2013. 41(1): p. 252-7.
24. Inal, J.M., Ansa-Addo, E.A., and Lange, S., *Interplay of host-pathogen microvesicles and their role in infectious disease*. Biochem Soc Trans, 2013. 41(1): p. 258-62.
25. Silverman, J.M. and Reiner, N.E., *Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes*. Cell Microbiol, 2011. 13(1): p. 1-9.
26. Marcilla, A., Trelis, M., Cortes, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Minguez, M.T., Valero, M.L., Sanchez Del Pino, M.M., Munoz-Antoli, C., Toledo, R., and Bernal, D., *Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells*. PLoS One, 2012. 7(9): p. e45974.
27. Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., and Casadevall, A., *Extracellular vesicles produced by Cryptococcus neoformans contain protein components associated with virulence*. Eukaryot Cell, 2008. 7(1): p. 58-67.
28. Huang, S.H., Wu, C.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., Brown, R.J., and Jong, A., *Cryptococcus neoformans-Derived Microvesicles Enhance the Pathogenesis of Fungal Brain Infection*. PLoS One, 2012. 7(11): p. e48570.
29. Silverman, J.M., Clos, J., de'Oliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C., Foster, L.J., and Reiner, N.E., *An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages*. J Cell Sci, 2010. 123(Pt 6): p. 842-52.
30. Silverman, J.M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A.Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M.A., McMaster, W.R., Foster, L.J., Levings, M.K., and Reiner, N.E., *Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells*. J Immunol, 2010. 185(9): p. 5011-22.
31. Silverman, J.M. and Reiner, N.E., *Leishmania exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection*. Front Cell Infect Microbiol, 2011. 1: p. 26.
32. Ghosh, J., Bose, M., Roy, S., and Bhattacharyya, S.N., *Leishmania donovani targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection*. Cell Host Microbe, 2013. 13(3): p. 277-88.
33. WHO. *Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet*. 2013 17/09/2013]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.
34. Rassi, A., Jr., Rassi, A., and Marin-Neto, J.A., *Chagas disease*. Lancet, 2010. 375(9723): p. 1388-402.

35. Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., and Krishna, S., *The trypanosomiases*. Lancet, 2003. 362(9394): p. 1469-80.
36. Tyler, K.M. and Engman, D.M., *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited*. Int J Parasitol, 2001. 31(5-6): p. 472-81.
37. Florencio-Martinez, L., Marquez-Duenas, C., Ballesteros-Rodea, G., Martinez-Calvillo, S., and Manning-Cela, R., *Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol, 2010. 126(3): p. 332-6.
38. Clayton, C. and Shapira, M., *Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias*. Mol Biochem Parasitol, 2007. 156(2): p. 93-101.
39. Cecil, R.L., Goldman, L., and Ausiello, D.A., *Cecil medicine*. 23rd ed. 2008, Philadelphia: Saunders Elsevier. xxxiii, 3078 p.
40. Gonzalez, A., Lerner, T.J., Huecas, M., Sosa-Pineda, B., Nogueira, N., and Lizardi, P.M., *Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res, 1985. 13(16): p. 5789-804.
41. Johnson, P.J., Kooter, J.M., and Borst, P., *Inactivation of transcription by UV irradiation of T. brucei provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene*. Cell, 1987. 51(2): p. 273-81.
42. Clayton, C.E., *Life without transcriptional control? From fly to man and back again*. EMBO J, 2002. 21(8): p. 1881-8.
43. Hug, M., Hotz, H.R., Hartmann, C., and Clayton, C., *Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor*. Mol Cell Biol, 1994. 14(11): p. 7428-35.
44. Matthews, K.R., Tschudi, C., and Ullu, E., *A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes*. Genes Dev, 1994. 8(4): p. 491-501.
45. Palenchar, J.B. and Bellofatto, V., *Gene transcription in trypanosomes*. Mol Biochem Parasitol, 2006. 146(2): p. 135-41.
46. Milone, J., Wilusz, J., and Bellofatto, V., *Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(18): p. 4040-50.
47. Kramer, S., Queiroz, R., Ellis, L., Webb, H., Hoheisel, J.D., Clayton, C., and Carrington, M., *Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169*. J Cell Sci, 2008. 121(Pt 18): p. 3002-14.
48. Cerutti, H. and Casas-Mollano, J.A., *On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man*. Curr Genet, 2006. 50(2): p. 81-99.
49. Kolev, N.G., Tschudi, C., and Ullu, E., *RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges*. Eukaryot Cell, 2011. 10(9): p. 1156-63.
50. Garcia Silva, M.R., Tosar, J.P., Frugier, M., Pantano, S., Bonilla, B., Esteban, L., Serra, E., Rovira, C., Robello, C., and Cayota, A., *Cloning, characterization and subcellular localization of a Trypanosoma cruzi argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids*. Gene, 2010. 466(1-2): p. 26-35.
51. Jinek, M. and Doudna, J.A., *A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference*. Nature, 2009. 457(7228): p. 405-12.
52. Garcia-Silva, M.R., Frugier, M., Tosar, J.P., Correa-Dominguez, A., Ronalte-Alves, L., Parodi-Talice, A., Rovira, C., Robello, C., Goldenberg, S., and Cayota, A., *A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in Trypanosoma cruzi and recruited to specific cytoplasmic granules*. Mol Biochem Parasitol, 2010. 171(2): p. 64-73.
53. Goncalves, M.F., Umezawa, E.S., Katzin, A.M., de Souza, W., Alves, M.J., Zingales, B., and Colli, W., *Trypanosoma cruzi: shedding of surface antigens as membrane vesicles*. Exp Parasitol, 1991. 72(1): p. 43-53.

54. Bayer-Santos, E., Aguilar-Bonavides, C., Rodrigues, S.P., Cordero, E.M., Marques, A.F., Varela-Ramirez, A., Choi, H., Yoshida, N., da Silveira, J.F., and Almeida, I.C., *Proteomic analysis of Trypanosoma cruzi secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins*. J Proteome Res, 2013. 12(2): p. 883-97.
55. Trocoli Torrecilhas, A.C., Tonelli, R.R., Pavanelli, W.R., da Silva, J.S., Schumacher, R.I., de Souza, W., NC, E.S., de Almeida Abrahamsohn, I., Colli, W., and Manso Alves, M.J., *Trypanosoma cruzi: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response*. Microbes Infect, 2009. 11(1): p. 29-39.
56. Torrecilhas, A.C., Schumacher, R.I., Alves, M.J., and Colli, W., *Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases*. Microbes Infect, 2012 14(15): p. 1465-74.
57. Torrecilhas, A.C., Nakayasu, E.S., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Colli, W., Manso Alves, M.J., and de Almeida, I.C., *Trypanosoma cruzi: trypomastigotes secrete vesicles with proinflammatory virulence factors that enhance cell invasion*. Journal of Extracellular Vesicles, 2013. Abstracts from the Second International Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles(2).
58. Lambertz, U., Ovando, M.O., Unrau, P., Ramasamy, G., Myler, P., and Reiner, N., *Leishmania release exosomes containing short RNA sequences*. Journal of Extracellular Vesicles, 2013. Abstracts from the Second International Meeting of the International Society for Extracellular Vesicles(2).
59. Farazi, T.A., Juranek, S.A., and Tuschl, T., *The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members*. Development, 2008. 135(7): p. 1201-14.
60. Tuck, A.C. and Tollervey, D., *RNA in pieces*. Trends Genet, 2011. 27(10): p. 422-32.
61. Pederson, T., *Regulatory RNAs derived from transfer RNA? Rna*, 2010. 16(10): p. 1865-9.
62. Sobala, A. and Hutvagner, G., *Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2011. 2(6): p. 853-62.
63. Cole, C., Sobala, A., Lu, C., Thatcher, S.R., Bowman, A., Brown, J.W., Green, P.J., Barton, G.J., and Hutvagner, G., *Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs*. RNA, 2009. 15(12): p. 2147-60.
64. Kawaji, H., Nakamura, M., Takahashi, Y., Sandelin, A., Katayama, S., Fukuda, S., Daub, C.O., Kai, C., Kawai, J., Yasuda, J., Carninci, P., and Hayashizaki, Y., *Hidden layers of human small RNAs*. BMC Genomics, 2008. 9 (157).
65. Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., and Dutta, A., *A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)*. Genes Dev, 2009. 23(22): p. 2639-49.
66. Franzen, O., Arner, E., Ferella, M., Nilsson, D., Respuela, P., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Aslund, L., Andersson, B., and Daub, C.O., *The short non-coding transcriptome of the protozoan parasite Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. 5(8): p. e1283.
67. Haiser, H.J., Karginov, F.V., Hannon, G.J., and Elliot, M.A., *Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium Streptomyces coelicolor*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(3): p. 732-41.
68. Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A.Z., and Kay, M.A., *Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing*. Rna, 2010. 16(4): p. 673-95.
69. Jochl, C., Rederstorff, M., Hertel, J., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., Schrettl, M., Haas, H., and Huttenhofer, A., *Small ncRNA transcriptome analysis from Aspergillus fumigatus suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(8): p. 2677-89.
70. Lee, S.R. and Collins, K., *Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in Tetrahymena thermophila*. J Biol Chem, 2005. 280(52): p. 42744-9.

71. Li, Y., Luo, J., Zhou, H., Liao, J.Y., Ma, L.M., Chen, Y.Q., and Qu, L.H., *Stress-induced tRNA-derived RNAs: a novel class of small RNAs in the primitive eukaryote Giardia lamblia*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(19): p. 6048-55.
72. Ogawa, T., Tomita, K., Ueda, T., Watanabe, K., Uozumi, T., and Masaki, H., *A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons*. Science, 1999. 283(5410): p. 2097-100.
73. Schaefer, M., Pollex, T., Hanna, K., Tuorto, F., Meusbürger, M., Helm, M., and Lyko, F., *RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage*. Genes Dev, 2010. 24(15): p. 1590-5.
74. Thompson, D.M. and Parker, R., *The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2009. 185(1): p. 43-50.
75. Tomita, K., Ogawa, T., Uozumi, T., Watanabe, K., and Masaki, H., *A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(15): p. 8278-83.
76. Zhang, S., Sun, L., and Kragler, F., *The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation*. Plant Physiol, 2009. 150(1): p. 378-87.
77. Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J., and Parker, R., *tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes*. RNA, 2008. 14(10): p. 2095-103.
78. Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., and Zheng, X., *Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells*. FEBS Lett, 2009. 583(2): p. 437-42.
79. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G.F., and Anderson, P., *Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression*. J Cell Biol, 2009. 185(1): p. 35-42.
80. Garcia-Silva, M.R., Cabrera-Cabrera, F., Güida, M.C., and Cayota, A., *Hints of tRNA-Derived Small RNAs Role in RNA Silencing Mechanisms*. Genes, 2012. 3(4): p. 603-614.
81. Thompson, D.M. and Parker, R., *Stressing out over tRNA cleavage*. Cell, 2009. 138(2): p. 215-9.
82. Emara, M.M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G.F., and Anderson, P., *Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly*. J Biol Chem, 2010. 285(14): p. 10959-68.
83. Ivanov, P., Emara, M.M., Villen, J., Gygi, S.P., and Anderson, P., *Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation*. Mol Cell, 2011. 43(4): p. 613-23.
84. Nakashima, A., Takaku, H., Shibata, H.S., Negishi, Y., Takagi, M., Tamura, M., and Nashimoto, M., *Gene silencing by the tRNA maturase tRNase ZL under the direction of small-guide RNA*. Gene Ther, 2007. 14(1): p. 78-85.
85. Elbarbary, R.A., Takaku, H., Uchiyumi, N., Tamiya, H., Abe, M., Takahashi, M., Nishida, H., and Nashimoto, M., *Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase Z(L) through 5'-half-tRNA*. PLoS One, 2009. 4(6): p. e5908.
86. Liao, J.Y., Ma, L.M., Guo, Y.H., Zhang, Y.C., Zhou, H., Shao, P., Chen, Y.Q., and Qu, L.H., *Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers*. PLoS One, 2010. 5(5): p. e10563.
87. Li, Z., Ender, C., Meister, G., Moore, P.S., Chang, Y., and John, B., *Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(14): p. 6787-99.
88. Burroughs, A.M., Ando, Y., de Hoon, M.J., Tomaru, Y., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., and Daub, C.O., *Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin*. RNA Biol, 2011. 8(1): p. 158-77.
89. Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A., *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. 4(1): p. 44-57.

90. Huang da, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A., *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(1): p. 1-13.
91. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
92. Gardiner, C., Ferreira, Y.J., Dragovic, R.A., Redman, C.W.G., and Sargent, I.L., *Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis*. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013(2).
93. Svensson, K.J., Christianson, H.C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L.M., Morgelin, M., and Belting, M., *Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1*. *J Biol Chem*, 2013. 288(24): p. 17713-24.
94. Feng, D., Zhao, W.L., Ye, Y.Y., Bai, X.C., Liu, R.Q., Chang, L.F., Zhou, Q., and Sui, S.F., *Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis*. *Traffic*, 2010. 11(5): p. 675-87.
95. Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., Zahorchak, A.F., Logar, A.J., Wang, Z., Watkins, S.C., Falo, L.D., Jr., and Thomson, A.W., *Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells*. *Blood*, 2004. 104(10): p. 3257-66.
96. Tian, T., Zhu, Y.L., Hu, F.H., Wang, Y.Y., Huang, N.P., and Xiao, Z.D., *Dynamics of exosome internalization and trafficking*. *J Cell Physiol*, 2013. 228(7): p. 1487-95.
97. Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., and Xiao, Z., *Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy*. *J Cell Biochem*, 2010. 111(2): p. 488-96.
98. Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., and Costa, J., *Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells*. *BMC Cancer*, 2011. 11(108).
99. Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., and Fais, S., *Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells*. *J Biol Chem*, 2009. 284(49): p. 34211-22.
100. Vago, R., Marsden, C.J., Lord, J.M., Ippoliti, R., Flavell, D.J., Flavell, S.U., Ceriotti, A., and Fabbrini, M.S., *Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells*. *FEBS J*, 2005. 272(19): p. 4983-95.
101. Sandvig, K. and van Deurs, B., *Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins*. *Gene Ther*, 2005. 12(11): p. 865-72.
102. Lopez-Verrilli, M.A. and Court, F.A., *Exosomes: mediators of communication in eukaryotes*. *Biol Res*, 2013. 46(1): p. 5-11.
103. Janeway, C.A.J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J., *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. 5th edition ed. 2001, New York: Garland Science.
104. Amara, U., Flierl, M.A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Bruckner, U.B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J.D., and Huber-Lang, M., *Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems*. *J Immunol*, 2010. 185(9): p. 5628-36.
105. Markiewski, M.M., Nilsson, B., Ekdahl, K.N., Mollnes, T.E., and Lambris, J.D., *Complement and coagulation: strangers or partners in crime?* *Trends Immunol*, 2007. 28(4): p. 184-92.
106. Rittirsch, D., Flierl, M.A., and Ward, P.A., *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(10): p. 776-87.
107. Ramirez, G., Valck, C., Aguilar, L., Kemmerling, U., Lopez-Munoz, R., Cabrera, G., Morello, A., Ferreira, J., Maya, J.D., Galanti, N., and Ferreira, A., *Roles of Trypanosoma*

- cruzi calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth.* Mol Immunol, 2012. 52(3-4): p. 133-40.
108. Ferreira, V., Molina, M.C., Schwaeble, W., Lemus, D., and Ferreira, A., *Does Trypanosoma cruzi calreticulin modulate the complement system and angiogenesis?* Trends Parasitol, 2005. 21(4): p. 169-74.
 109. Valck, C., Ramirez, G., Lopez, N., Ribeiro, C.H., Maldonado, I., Sanchez, G., Ferreira, V.P., Schwaeble, W., and Ferreira, A., *Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by Trypanosoma cruzi calreticulin.* Mol Immunol, 2010. 47(7-8): p. 1516-21.
 110. Ramirez, G., Valck, C., Ferreira, V.P., Lopez, N., and Ferreira, A., *Extracellular Trypanosoma cruzi calreticulin in the host-parasite interplay.* Trends Parasitol, 2011. 27(3): p. 115-22.
 111. Magalhaes, J.G., Sorbara, M.T., Girardin, S.E., and Philpott, D.J., *What is new with Nods?* Curr Opin Immunol, 2011. 23(1): p. 29-34.
 112. Rathinam, V.A., Vanaja, S.K., and Fitzgerald, K.A., *Regulation of inflammasome signaling.* Nat Immunol, 2012. 13(4): p. 333-2.
 113. Aoki, M.P., Carrera-Silva, E.A., Cuervo, H., Fresno, M., Girones, N., and Gea, S., *Nonimmune Cells Contribute to Crosstalk between Immune Cells and Inflammatory Mediators in the Innate Response to Trypanosoma cruzi Infection.* J Parasitol Res, 2012. 2012 (737324).
 114. Correa, R.G., Milutinovic, S., and Reed, J.C., *Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases.* Biosci Rep, 2012. 32(6): p. 597-608.
 115. Silva, G.K., Gutierrez, F.R., Guedes, P.M., Horta, C.V., Cunha, L.D., Mineo, T.W., Santiago-Silva, J., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., Silva, J.S., and Zamboni, D.S., *Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against Trypanosoma cruzi infection.* J Immunol, 2010. 184(3): p. 1148-52.
 116. Silva, G.K., Costa, R.S., Silveira, T.N., Caetano, B.C., Horta, C.V., Gutierrez, F.R., Guedes, P.M., Andrade, W.A., De Niz, M., Gazzinelli, R.T., Zamboni, D.S., and Silva, J.S., *Apoptosis-Associated Speck-like Protein Containing a Caspase Recruitment Domain Inflammasomes Mediate IL-1beta Response and Host Resistance to Trypanosoma cruzi Infection.* J Immunol, 2013.
 117. Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M., *Interleukin-1 (IL-1) pathway.* Sci Signal, 2010. 3(105):
 118. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases.* Blood, 2011. 117(14): p. 3720-32.
 119. *Patent Watch.* Nature Reviews Drug Discovery, 2006. 5(10): p. 810-811.
 120. Hanna, S. and El-Sibai, M., *Signaling networks of Rho GTPases in cell motility.* Cell Signal, 2013. 25(10): p. 1955-61.
 121. Jaffe, A.B. and Hall, A., *Rho GTPases: biochemistry and biology.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. 21: p. 247-69.
 122. Aronheim, A., Broder, Y.C., Cohen, A., Fritsch, A., Belisle, B., and Abo, A., *Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton.* Curr Biol, 1998. 8(20): p. 1125-8.
 123. Epting, C.L., Coates, B.M., and Engman, D.M., *Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi.* Exp Parasitol, 2010. 126(3): p. 283-91.
 124. Yoshida, N., *Molecular basis of mammalian cell invasion by Trypanosoma cruzi.* An Acad Bras Cienc, 2006. 78(1): p. 87-111.
 125. Mott, A., Lenormand, G., Costales, J., Fredberg, J.J., and Burleigh, B.A., *Modulation of host cell mechanics by Trypanosoma cruzi.* J Cell Physiol, 2009. 218(2): p. 315-22.
 126. Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G., *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.* Cardiovasc Res, 2006. 69(3): p. 562-73.

127. Alves, M.J. and Colli, W., *Trypanosoma cruzi: adhesion to the host cell and intracellular survival*. IUBMB Life, 2007. 59(4-5): p. 274-9.
128. Maeda, F.Y., Cortez, C., and Yoshida, N., *Cell signaling during Trypanosoma cruzi invasion*. Front Immunol, 2012. 3(361).
129. Castillo, C., Lopez-Munoz, R., Duaso, J., Galanti, N., Jana, F., Ferreira, J., Cabrera, G., Maya, J.D., and Kemmerling, U., *Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo Trypanosoma cruzi infection of human placental chorionic villi*. Placenta, 2012. 33(12): p. 991-7.
130. Gutierrez, F.R., Lalu, M.M., Mariano, F.S., Milanezi, C.M., Cena, J., Gerlach, R.F., Santos, J.E., Torres-Duenas, D., Cunha, F.Q., Schulz, R., and Silva, J.S., *Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental Trypanosoma cruzi infection*. J Infect Dis, 2008. 197(10): p. 1468-76.
131. Hovsepian, E., Mirkin, G.A., Penas, F., Manzano, A., Bartrons, R., and Goren, N.B., *Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-Deoxy-Delta(12,14) prostaglandin J(2) in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes*. Int J Parasitol, 2011. 41(5): p. 553-62.
132. Geurts, N., Opdenakker, G., and Van den Steen, P.E., *Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections*. Pharmacol Ther, 2012. 133(3): p. 257-79.
133. Mauviel, A., *Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression*. J Cell Biochem, 1993. 53(4): p. 288-95.
134. Gomes, L.R., Terra, L.F., Wailemann, R.A., Labriola, L., and Sogayar, M.C., *TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells*. BMC Cancer, 2012. 12: p. 26.
135. Komiya, Y. and Habas, R., *Wnt signal transduction pathways*. Organogenesis, 2008. 4(2): p. 68-75.
136. Gordon, M.D. and Nusse, R., *Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors*. J Biol Chem, 2006. 281(32): p. 22429-33.
137. Cruciat, C.M. and Niehrs, C., *Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. 5(3).
138. Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., Adachi, S., Ohwada, S., Morishita, Y., Shibuya, H., and Akiyama, T., *Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein*. Genes Dev, 2000. 14(14): p. 1741-9.
139. Hu, T., Li, C., Cao, Z., Van Raay, T.J., Smith, J.G., Willert, K., Solnica-Krezel, L., and Coffey, R.J., *Myristoylated Naked2 antagonizes Wnt-beta-catenin activity by degrading Dishevelled-1 at the plasma membrane*. J Biol Chem, 2010. 285(18): p. 13561-8.
140. Aspenstrom, P., Richnau, N., and Johansson, A.S., *The diaphanous-related formin DAAM1 collaborates with the Rho GTPases RhoA and Cdc42, CIP4 and Src in regulating cell morphogenesis and actin dynamics*. Exp Cell Res, 2006. 312(12): p. 2180-94.
141. Liu, G., Bafico, A., and Aaronson, S.A., *The mechanism of endogenous receptor activation functionally distinguishes prototype canonical and noncanonical Wnts*. Mol Cell Biol, 2005. 25(9): p. 3475-82.
142. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(12): p. 767-79.
143. Caradonna, K.L. and Burleigh, B.A., *Mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi*. Adv Parasitol, 2011. 76: p. 33-61.
144. Burleigh, B.A., *Host cell signaling and Trypanosoma cruzi invasion: do all roads lead to lysosomes?* Sci STKE, 2005. 2005(293): p. pe36.
145. Jeannet, G., Boudousquie, C., Gardiol, N., Kang, J., Huelsken, J., and Held, W., *Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(21): p. 9777-82.

146. Manicassamy, S., Reizis, B., Ravindran, R., Nakaya, H., Salazar-Gonzalez, R.M., Wang, Y.C., and Pulendran, B., *Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine*. Science, 2010. 329(5993): p. 849-53.
147. Bansal, K., Trinath, J., Chakravorty, D., Patil, S.A., and Balaji, K.N., *Pathogen-specific TLR2 protein activation programs macrophages to induce Wnt-beta-catenin signaling*. J Biol Chem, 2011. 286(42): p. 37032-44.
148. Vaena de Avalos, S., Blader, I.J., Fisher, M., Boothroyd, J.C., and Burleigh, B.A., *Immediate/early response to Trypanosoma cruzi infection involves minimal modulation of host cell transcription*. J Biol Chem, 2002. 277(1): p. 639-44.
149. Moore-Lai, D. and Rowland, E., *Microarray data demonstrate that Trypanosoma cruzi downregulates the expression of apoptotic genes in BALB/c fibroblasts*. J Parasitol, 2004. 90(4): p. 893-5.
150. Shigihara, T., Hashimoto, M., Shindo, N., and Aoki, T., *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.
151. Costales, J.A., Daily, J.P., and Burleigh, B.A., *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.
152. Manque, P.A., Probst, C.M., Pereira, M.C., Rampazzo, R.C., Ozaki, L.S., Pavoni, D.P., Silva Neto, D.T., Carvalho, M.R., Xu, P., Serrano, M.G., Alves, J.M., Meirelles Mde, N., Goldenberg, S., Krieger, M.A., and Buck, G.A., *Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes*. Infect Immun, 2011. 79(5): p. 1855-62.
153. Lopez, N.C., Valck, C., Ramirez, G., Rodriguez, M., Ribeiro, C., Orellana, J., Maldonado, I., Albin, A., Anaconda, D., Lemus, D., Aguilar, L., Schwaeble, W., and Ferreira, A., *Antiangiogenic and antitumor effects of Trypanosoma cruzi Calreticulin*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. 4(7): p. e730.
154. Molina, M.C., Ferreira, V., Valck, C., Aguilar, L., Orellana, J., Rojas, A., Ramirez, G., Billetta, R., Schwaeble, W., Lemus, D., and Ferreira, A., *An in vivo role for Trypanosoma cruzi calreticulin in antiangiogenesis*. Mol Biochem Parasitol, 2005. 140(2): p. 133-40.
155. Daemen, S., Kutmon, M., and Evelo, C.T., *A pathway approach to investigate the function and regulation of SREBPs*. Genes Nutr, 2013. 8(3): p. 289-300.
156. Wahli, W. and Michalik, L., *PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation*. Trends Endocrinol Metab, 2012. 23(7): p. 351-63.
157. Varga, T., Czimmerer, Z., and Nagy, L., *PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation*. Biochim Biophys Acta, 2011. 1812(8): p. 1007-22.
158. Caradonna, K.L., Engel, J.C., Jacobi, D., Lee, C.H., and Burleigh, B.A., *Host metabolism regulates intracellular growth of Trypanosoma cruzi*. Cell Host Microbe, 2013. 13(1): p. 108-17.
159. Rynes, J., Donohoe, C.D., Frommolt, P., Brodesser, S., Jindra, M., and Uhlirova, M., *Activating transcription factor 3 regulates immune and metabolic homeostasis*. Mol Cell Biol, 2012. 32(19): p. 3949-62.
160. Thompson, M.R., Xu, D., and Williams, B.R., *ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer*. J Mol Med (Berl), 2009. 87(11): p. 1053-60.
161. da Silva, J.B., Carvalho, E., Covarrubias, A.E., Ching, A.T., Mattaraia, V.G., Paiva, D., de Franco, M., Favaro, R.D., Pereira, M.M., Vasconcellos, S., Zorn, T.T., Ho, P.L., and Martins, E.A., *Induction of TNF-alfa and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic Leptospira*. Microb Pathog, 2012. 52(4): p. 206-16.
162. Ha, J., Lee, Y., and Kim, H.H., *CXCL2 mediates lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis in RANKL-primed precursors*. Cytokine, 2011. 55(1): p. 48-55.
163. Caunt, C.J. and Keyse, S.M., *Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling*. FEBS J, 2013. 280(2): p. 489-504.

164. Dickinson, R.J. and Keyse, S.M., *Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases*. J Cell Sci, 2006. 119(Pt 22): p. 4607-15.
165. Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., and Daly, R.J., *Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets*. Biochem J, 2009. 418(3): p. 475-89.
166. Vasudevan, S., *Posttranscriptional upregulation by microRNAs*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. 3(3): p. 311-30.

7. Anexos

Tabla S1. Sondas empleadas para la transfección de células HeLa y electroporación de MVs. Las sondas empleadas para transfección tienen la secuencia correspondiente a dos tsRNAs y sus contrapartes irrelevantes, mientras que las sondas para electroporación corresponden a un stRNA empleado usualmente en nuestro grupo de trabajo. Se muestra el nombre de cada oligonucleótido sintético, su secuencia y el fluoróforo que tiene acoplado. Los asteriscos hacen referencia a las modificaciones presentes en los nucleótidos (agregado de 2-O-metilo y esqueleto de fosforotioato)

Nombre	Secuencia (5'-3')	Fluoróforo
tsRNA-Leu	A*A*C*GUCAAGUCUUAGACCACUCGACCAUCUUG*C*C*	Cy3
tsRNA-Leu-Scr	A*C*A*CCAUUACUCGCACUACCAUCCGACGUAGU*U*G*	Cy3
tsRNA-Thr	G*A*C*GGAGGUCGGGGGUUCGAUCCCCCAGUGG*C*C*	FAM
tsRNA-Thr-Scr	G*C*G*GUGCGCGACGUCCGGUCGGCGAUUCGCAC*A*G*	FAM
tsRNA-Glu	CAGGTGTTGTAACCGTTATACCATATC	Cy3/FAM

Tabla S2. Primers utilizados para la validación de los resultados de microarreglos. Se presentan las secuencias de los primers utilizados durante los ensayos de qPCR, diseñados para la amplificación de los genes ATF3, CXCL2, DUSP6 y GAPDH. F: primer forward o directo; R: primer reverse o reverso.

Nombre	Secuencia (5'-3')
ATF3 F	GGAGCCTGGAGCAAATGATG
ATF3 R	GACGATGGCAGAAGCACTCA
CXCL2 F	ACGGCAGGGAAATGTATGTGT
CXCL2 R	TCGAAACCTCTCTGCTCTAACA
DUSP6 F	GCGGATCAGCTCTGACTCTT
DUSP6 R	CCATCCGAGTCTGTTGCACT
GAPDH F	CCAGTGACTCCACGACGTA
GAPDH R	GCGAGATCCCTCCAAAATCA

Tabla S3. Vías identificadas como afectadas 6 horas luego del tratamiento con MVs. Se presenta para cada vía el p-valor asociado así como el número de genes modificados pertenecientes a la vía. Se muestran los resultados obtenidos tanto con el software GeneSpring como con la herramienta DAVID.

Vía	p-valor	N° de genes
GeneSpring		
Osificación endocondral	6,88E-06	8
Diferenciación de la cresta neural	9,30E-04	6
Regulación del citoesqueleto de actina	0,002	8
Receptores nucleares	0,003	4
Vía de señalización de Wnt	0,005	6
Angiogénesis	0,006	3
Adhesión focal	0,009	8
Infección con E.coli	0,012	4
Contracción y relajación del miometrio	0,012	7
Receptores nucleares del metabolismo lipídico	0,015	3
Vía de señalización de Notch	0,016	4
Vía integrada de cáncer de páncreas	0,016	8

Vía de señalización por TSH	0,020	4
Contracción del músculo estriado	0,022	3
Metabolismo de vitamina A y carotenoides	0,022	3
Vía de receptores NOD	0,024	3
Desarrollo del corazón	0,033	3
Cascada del complemento y la coagulación	0,045	3
Señalización por SERBP	0,045	3
DAVID		
Funcionalización de fase 1	0,027	3
Cascada del complemento y la coagulación	0,027	6
Vías en cáncer	0,033	15
Vía de señalización de Wnt	0,033	9
Carcinoma de células basales	0,048	5
Señalización por FGFR	0,054	3
Señalización por Rho GTPasas	0,054	6

Tabla S4. Vías identificadas como afectadas 24 horas luego del tratamiento con MVs. Se presenta para cada vía el p-valor asociado así como el número de genes modificados pertenecientes a la vía. Se muestran los resultados obtenidos tanto con el software GeneSpring como con la herramienta DAVID.

Vía	p-valor	N° de genes
GeneSpring		
Metabolismo de vitamina A y carotenoides	3,04E-05	5
Osificación endocondral	3,18E-05	6
Adipogénesis	2,69E-04	7
Adhesión focal	4,26E-04	8
Contracción del músculo estriado	4,73E-04	4
Metaloproteinasas de matriz	0,003	3
Contracción y relajación del miometrio	0,004	6
Desarrollo del corazón	0,009	3
Señalización por IL-1	0,013	3
Regulación del citoesqueleto de actina	0,013	5
Vía de señalización de Wnt	0,015	4
Señalización por TGF- β	0,015	3
Adhesión celular mediada por integrinas	0,015	4
Senescencia y autofagia	0,019	4
Vía de señalización por TSH	0,025	3
Receptores nucleares del metabolismo lipídico	0,026	3
Diferenciación de la cresta neural	0,031	3
DAVID		
Señalización por Rho GTPasas	9,84E-05	9
Vías en cáncer	0,003	14
Inhibición de metaloproteinasas de matriz	0,019	3
Vía de señalización por receptores tipo NOD	0,019	5
Metabolismo de pirimidinas	0,039	3
Cardiomiopatía hipertrófica	0,053	5

Tabla S5. Vías identificadas como afectadas a partir de la lista de genes comunes a las 6 y 24 horas luego del tratamiento con MVs. Se presenta para cada vía el p-valor asociado así como el número de genes modificados pertenecientes a la vía. Se muestran los resultados obtenidos con el software GeneSpring.

Vía	p-valor	N° de genes
GeneSpring		
Osificación endocondral	5,49E-05	5
Metabolismo de vitamina A y carotenoides	0,002	3
Contracción del músculo estriado	0,002	3
Regulación del citoesqueleto de actina	0,003	5
Adhesión focal	0,007	5
Vía de señalización por TSH	0,009	3
Vía de señalización de Wnt	0,026	3
Adhesión celular mediada por integrinas	0,026	3

Figura S1. Microscopía electrónica de transmisión de las MVs obtenidas mediante el protocolo de purificación. Se presenta una imagen de microscopía electrónica de transmisión de las MVs purificadas por el protocolo de centrifugación diferencial a partir del sobrenadante de cultivo de epimastigotas de *T. cruzi*. Se observa una población heterogénea de vesículas.

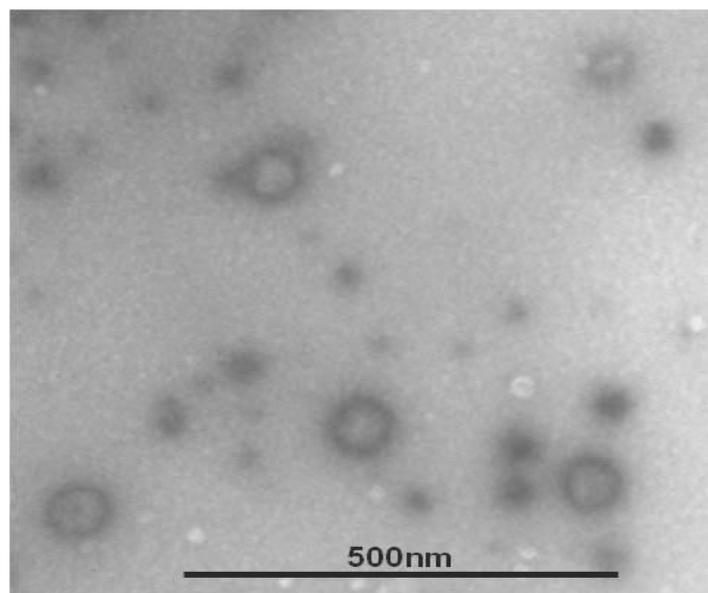


Figura S2. Vía del complemento y la coagulación. Se presenta un esquema de la vía del complemento y la coagulación tal como se obtiene a través de la herramienta DAVID durante el análisis de vías. La misma se encuentra disponible a través de KEGG (<http://www.kegg.jp/>). Sobre esta se han indicado en rojo los genes sub-expresados y en verde los sobre-expresados.

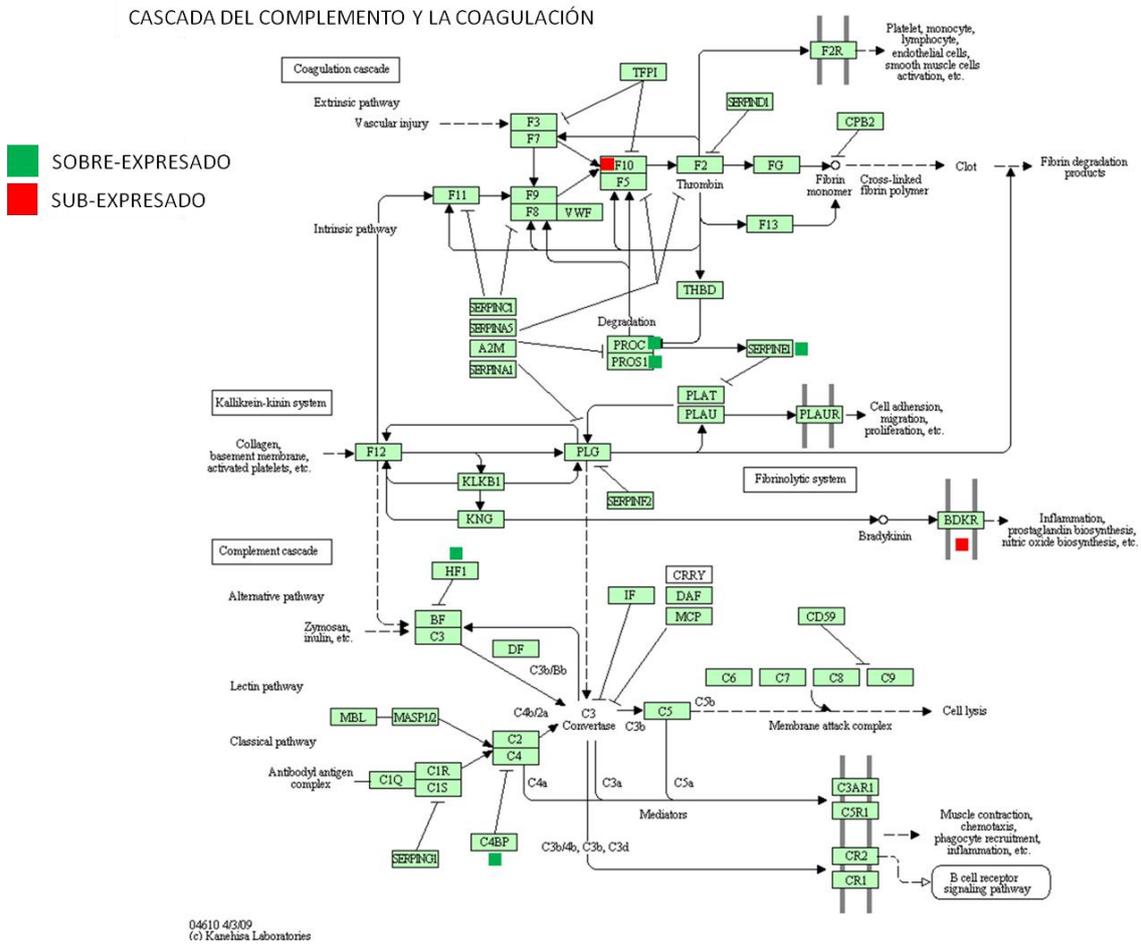
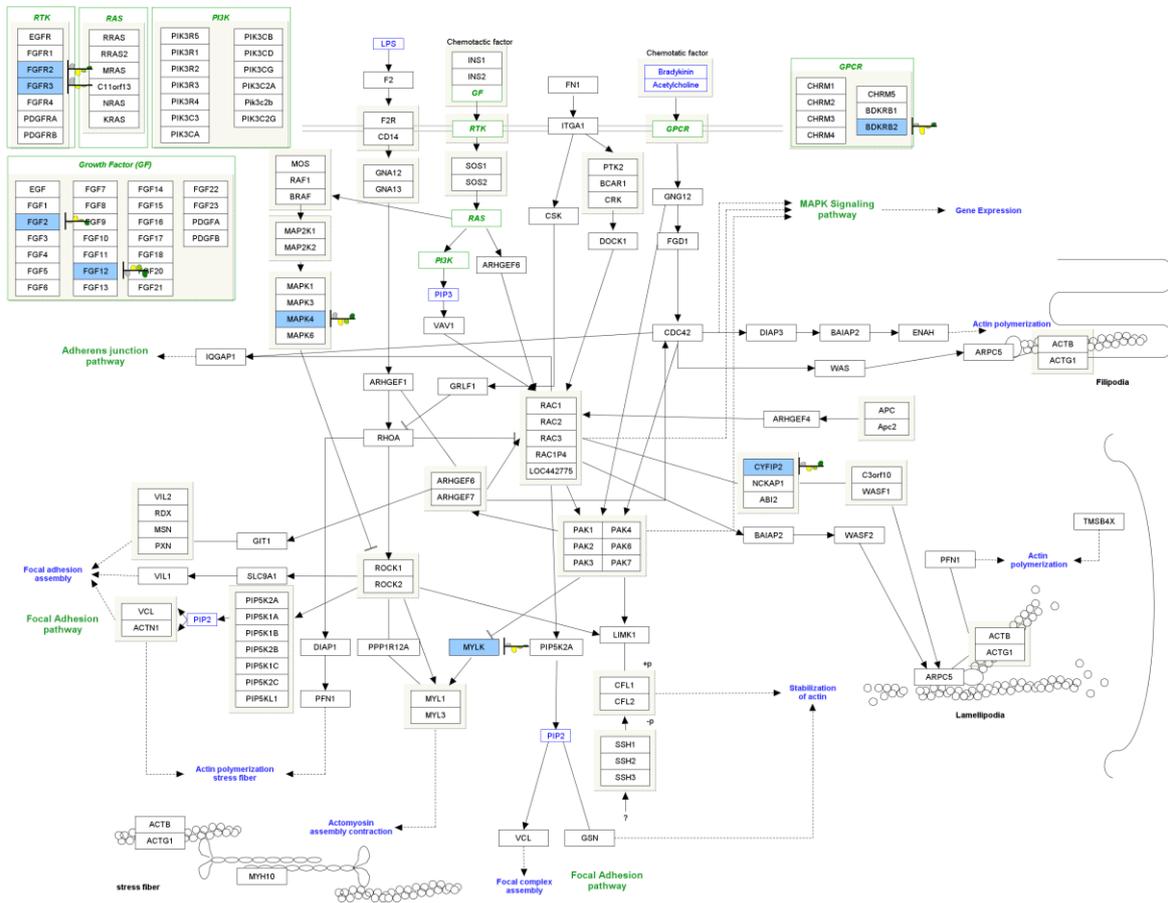


Figura S3. Regulación del citoesqueleto de actina. Se presenta la imagen que devuelve el software GeneSpring durante el análisis de vías. Los genes afectados por el tratamiento se marcan en celeste, y el sentido de la regulación se indica al lado del gen como un pequeño gráfico, donde los genes sobre-expresados se ven como una barra sobre el eje de las x con valores positivos, y los sub-expresados con valores negativos.



Soluciones y buffers**Medio LIT**

Infusión de hígado 5g/L

NaCl 4.4 g/L

KCl 0.4 g/L

Glucosa 2.2 g/L

Triptosa 5 g/L

Fosfato dibásico de Sodio 11.56 g/L

Extracto de levadura 15 g/L

PBS 1X

KCl 2,7 mM

KH₂PO₄ 1,4 mM

Na₂HPO₄ 4 mM

NaCl 137 mM

HBS

HEPES 21 mM

NaCl 3 M

KCl 5 mM

Glucosa 6 mM

SSC 20X

NaCl 3 M

Citrato de Sodio 0,3M pH 7

Denhardt

Seroalbúmina bovina 2%,

Ficoll 400 2%

Polivinilpirrolidona (PVP) 2%

Buffer de hibridación

Seroalbúmina bovina 2%,

Denhardt 5X

SSC 4X

Formamida 35%