



## Estudios de transcriptómica comparativa en amastigotas axénicas versus amastigotas celulares de *Trypanosoma cruzi*

Lic. Lucía Bilbao  
Orientador: Dr. Pablo Smircich  
Co-orientadora: Dra. Leticia Pérez Díaz

Tesis de Maestría

PEDECIBA Biología

Sección Genómica Funcional. Facultad de Ciencias (UdelaR)  
Laboratorio de Bioinformática. Departamento de Genómica. IIBCE (MEC)

# Índice

1	Abreviaturas .....	4
2	Resumen.....	5
3	Introducción .....	6
3.1	Enfermedad de Chagas y su epidemiología .....	6
3.2	Genoma y regulación de la expresión génica en <i>T. cruzi</i> .....	9
3.3	Ciclo de vida y biología celular de <i>T. cruzi</i> .....	10
3.4	Interacción hospedero-parásito y rol de las moléculas de superficie.....	14
3.5	Generalidades de los amastigotas .....	19
3.6	Amastigogenesis intracelular y amastigogénesis axénica.....	21
4	Antecedentes .....	25
5	Objetivos .....	27
5.1	Objetivo general.....	27
5.2	Objetivos específicos.....	27
6	Materiales y métodos .....	28
6.1	Medios de cultivo y soluciones utilizadas .....	28
6.2	Cultivo de diferentes formas de <i>T. cruzi</i> .....	28
6.2.1	Cultivo de epimastigotas.....	28
6.2.2	Cultivo de células de mamífero.....	28
6.2.3	Infección de células de mamífero (infección primaria).....	28
6.2.4	Infección de células de mamífero con tripomastigotas celulares (infección secundaria).....	29
6.3	Obtención de las distintas muestras.....	29
6.3.1	Extracción de amastigotas intracelulares.....	29
6.3.2	Obtención y purificación de tripomastigotas celulares .....	30
6.3.3	Obtención y purificación de amastigotas axénicos ( <i>in vitro</i> ) .....	30
6.4	Extracción de ARN y evaluación de calidad.....	30
6.5	Retrotranscripción del ARNm y PCR en tiempo real .....	31
6.6	Secuenciación y tratamiento inicial de los datos .....	32
6.7	Obtención de lecturas para análisis de niveles de expresión .....	32
6.8	Búsqueda de genes de expresión diferencial.....	32
6.9	Análisis funcional.....	33
7	Resultados y discusión .....	34
7.1	Obtención y evaluación de muestras para secuenciar .....	34

7.2	Evaluación de calidad y tratamiento de los datos.....	35
7.3	Perfiles globales de expresión génica .....	37
7.4	Procesos biológicos diferenciales entre amastigotas celulares y axénicos.....	43
7.5	Relación hospedero-patógeno. Genes de infección y permanencia. ....	54
7.6	Proteínas de unión a ARN .....	57
7.7	Evaluación de protocolos alternativos de amastigogenesis axénica .....	58
8	Conclusiones y perspectivas.....	66
8.1	Conclusiones.....	66
8.2	Perspectivas .....	67
9	Referencias bibliográficas .....	68
10	Anexo.....	79

## 1 Abreviaturas

°C	Grado Celsius
μL	Microlitros
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
μg	Microgramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ADNsa	Desoxirribonucleasa
PBS	Tampón salino de fosfato
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dNTP	Desoxinucleósido -5' - trifosfato
g	Aceleración de la gravedad terrestre
SFB	Suero fetal bovino
BHI	Brain-Heart Infusion
PFA	Paraformaldeído
GPI	Glucosilfosfatidil inositol
hs	Horas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
pb	Pares de bases
PI	Post-incubación
SOD	Superóxido dismutasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno (Reactive oxygen species)

## 2 Resumen

*Trypanosoma cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas, un serio problema de salud pública en gran parte de la población de las Américas. Este organismo tiene un ciclo de vida complejo alternando entre formas que viven en el insecto vector y formas que infectan el hospedero mamífero. En particular, la forma epimastigota presente en el aparato digestivo del insecto es el estadio más frecuentemente utilizado como modelo de laboratorio dada la practicidad de su cultivo *in vitro*. Sin embargo, preguntas específicas y relevantes para los modelos de la patología de la enfermedad crónica requieren del cultivo de las formas intracelulares (amastigotas) y por lo tanto se han desarrollado métodos para su producción tanto *in vitro* (axénicos) como *in vivo* (celulares). Aunque los protocolos de amastigogénesis *in vitro* resultan más prácticos, su validez biológica ha sido cuestionada por la comunidad. En este proyecto se pretende caracterizar desde el punto de vista transcriptómico los amastigotas celulares y los axénicos, distinguiendo perfiles diferenciales que permitan evaluar a estos últimos como modelo. Los resultados obtenidos muestran que el modelo de amastigogénesis axénica utilizado presentó características similares a los celulares en cuanto a la regulación de proteínas flagelares y glicoproteínas de superficie, mientras que los procesos vinculados a la división celular y proliferación, metabolismo del proteasoma y sobrevivencia del parásito, no fueron recapitulados. Interesantemente, algunos de los resultados apuntan a que las formas diferenciadas *in vitro* podrían representar fases iniciales del proceso de diferenciación.

Haciendo uso de marcadores moleculares de procesos metabólicos característicos de amastigotas celulares que fueron definidos a partir de las listas de genes diferenciales obtenidas en los resultados anteriores, actualmente nos encontramos optimizando protocolos de amastigogénesis axénica.

### 3 Introducción

#### 3.1 Enfermedad de Chagas y su epidemiología

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). *T. cruzi* es un protista perteneciente a la Clase Zoomastigophora, Orden Kinetoplastidiae, Familia Trypanosomatidae, Género Trypanosoma y Subgénero Schizotrypanuma. Su clasificación taxonómica constituye una población muy heterogénea que consiste en un gran número de cepas con diferentes características en relación con distintas propiedades como la tasa de crecimiento, virulencia, perfil antigénico, patogenicidad, tropismo y sensibilidad a drogas antichagásicas. Además, tiene una gran diversidad genética y sus poblaciones naturales se dividen actualmente en seis subdivisiones genéticas, conocidas como Unidades de Tipificación Discretas (DTU), que tienen diferente distribución geográfica: TcI - TcVI. El concepto de DTU se refiere a un conjunto de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población, y son identificables por marcadores comunes, tanto genéticos, moleculares o inmunológicos (Tibayrenc, 1998; Zingales et al., 2009).

La enfermedad lleva el nombre de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, un médico e investigador brasileño que describió la enfermedad, el parásito que la causa y el insecto vector que la transmite en 1909 (WHO, 2021). Esta es la enfermedad más frecuente de las enfermedades tropicales transmisibles en América Latina. La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization, WHO*) estima que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, el parásito causante de esta enfermedad. Durante mucho tiempo, la enfermedad se limitó por completo a zonas rurales continentales de la Región de las Américas (excluyendo las islas del Caribe). Sin embargo, debido al aumento de la movilidad de la población en las últimas décadas, muchas de las personas infectadas viven ahora en entornos urbanos y la enfermedad se ha detectado en los Estados Unidos, Canadá y países europeos y africanos, del Mediterráneo Oriental y del Pacífico Occidental donde la enfermedad se ha diseminado mediante transmisión congénita o por trasplantes de órganos y transfusiones sanguíneas (PAHO, 2021).

La Organización Panamericana de la Salud (PAHO) estima que actualmente, unos 70 millones de personas en las Américas viven en áreas expuestas al Chagas y están en continuo riesgo de contraer la enfermedad. Está reportado que la incidencia anual es de 30.000 casos

nuevos. Además, por año se registran 12.000 muertes en promedio y 8.000 recién nacidos infectados durante la gestación (PAHO, 2021).

En zonas endémicas, el principal mecanismo de transmisión es vectorial, por hemípteros, de la Subfamilia *Triatominae* (con alimentación hematófaga) los cuales infectan personas expuestas a su picadura, al depositar sus heces infectadas en heridas de la piel o sobre mucosas. Los parásitos entran en el cuerpo cuando la persona rasca las heces del insecto en la picadura, y contamina los ojos, la boca, o en cualquier lesión que comprometa la integridad de la piel.

Esta patología ha sido clasificada dentro del grupo de enfermedades desatendidas debido a la baja inversión histórica por parte de la industria farmacéutica. Actualmente, no existe vacuna contra la enfermedad de Chagas. El control integrado de vectores ha sido el método de prevención más efectivo en América Latina. El análisis de sangre es necesario para prevenir la infección a través de la transfusión y el trasplante de órganos y para aumentar la detección y el cuidado de la población afectada en todo el mundo (WHO, 2018).

La patología se presenta en dos fases claramente diferenciadas (aguda y crónica), y una fase que puede presentarse como indeterminada. La fase inicial o aguda dura entre 4 y 8 semanas, y se caracteriza por la presencia de parásitos circulantes en la sangre y puede ser usualmente asintomática o presentar leves síntomas no específicos. Entre los síntomas, los que más se destacan son dolores de cabeza, edema en las extremidades inferiores o en la cara, dolor abdominal y/o torácico, erupción cutánea, diarrea, miocarditis y más raramente meningoencefalitis. Sin embargo, hasta un 70% de los casos nunca desarrollara manifestaciones clínicas de esta naturaleza (Rassi et al., 2010). En los pacientes que no desarrollaron síntomas se puede manifestar la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas o la forma crónica. La mayor parte de la población infectada en áreas endémicas se encuentran dentro de la fase indeterminada de la enfermedad (Nunes et al., 2013). Aproximadamente un tercio de los pacientes progresan desde la fase intermedia hacia la fase crónica (Malik et al., 2015). Las presentaciones clínicas de esta fase involucran patologías en órganos específicos, especialmente el corazón, el esófago o el colon, que están agrupados en tres formas principales de la enfermedad: cardíaca, digestiva o cardio-digestiva (Nunes et al., 2013). Durante esta fase, los parásitos están alojados principalmente en el corazón y el músculo digestivo por lo que hasta el 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta el 10% sufren alteraciones digestivas (generalmente agrandamiento del esófago o el colon), neurológicas o mixtas. En años posteriores, la infección puede provocar la muerte súbita debido a arritmias o insuficiencia cardíacas progresiva causada por la destrucción del músculo cardíaco y su sistema nervioso

(WHO, 2021). La fase crónica dura toda la vida del individuo y resulta en una disminución en la calidad y en la esperanza de vida de la población (Nunes et al., 2013). El equilibrio entre la contención inmunológica mediada por el parásito y el daño provocado en los tejidos del huésped a causa de la inflamación, probablemente determinan el curso de la enfermedad (Rassi et al., 2010).

La utilización de drogas antiparasitarias en la fase aguda puede curar la infección y prevenir manifestaciones crónicas. Se aconseja que el tratamiento antiparasitario sea administrado aún en pacientes crónicos, especialmente aquellos sin síntomas, ya que puede frenar la progresión de la enfermedad y prevenir la transmisión, por ejemplo, en la infección de madre a hijo (WHO, 2021). Los únicos medicamentos disponibles: benznidazol y nifurtimox, se usan hace más de 60 años y producen efectos secundarios graves lo cual afecta la efectividad de las drogas en esta etapa inicial. Los datos son escasos en cuanto a su efectividad para pacientes con infecciones crónicas, en esta etapa se requieren de largos tratamientos lo que también lleva a la aparición de cepas resistentes y a la discontinuidad del mismo, sobre todo en pacientes que viven en zonas endémicas de bajos recursos. Las manifestaciones clínicas en la fase aguda de la enfermedad se resuelven espontáneamente en un 90% de los pacientes infectados, incluso si estos no fueron tratados (Rassi et al., 2010). El aumento de la financiación e interés en los últimos años ha dado lugar a la aplicación de estrategias modernas de desarrollo de fármacos para nuevas terapias. Esto ha llevado al desarrollo del fármaco Fexinidazole (un derivado del 5-nitroimidazol) que presenta actividad contra otras especies de la familia de los kinetoplástidos (Deeks, 2019) y ha llegado a ensayos clínicos de fase II y fase III en humanos (Pérez-Molina et al., 2021). Sin embargo, aún se necesitan esfuerzos en el desarrollo de fármacos que sean efectivos con otros de los miembros de esta familia como *T. cruzi*.

Desde principios de la década de los 90, los países afectados por la enfermedad de Chagas junto con la OPS/OMS, generaron un exitoso esquema de cooperación técnica horizontal entre países, mediante las Iniciativas Subregionales de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas (Cono Sur, América Central y México, países andinos y países amazónicos). Las Iniciativas han permitido alcanzar reducciones importantes del número de casos agudos y de la presencia dentro de los domicilios de los vectores en todas las zonas endémicas, así como en la reducción de la morbilidad, la mortalidad y el sufrimiento de aquellos afectados (OPS, 2021). En este contexto, los esfuerzos son destinados casi exclusivamente hacia la erradicación y control vectorial de la enfermedad, desatendiendo la utilización de recursos económicos para la producción de una vacuna eficiente y/o nuevos tratamientos farmacológicos.

### 3.2 Genoma y regulación de la expresión génica en *T. cruzi*

CL Brener fue la cepa elegida como referencia para el proyecto genoma de *T. cruzi*, publicado en 2005 junto con la secuenciación de los genomas de los restantes tripanosomátidos modelo *T. brucei* (Berriman et al., 2005) y *L. major* (Ivens et al., 2005). Se determinó que el genoma de esta cepa de *T. cruzi* era de 60,3 Mb y estaba compuesto por aprox. 12.000 genes, y que el 50% del mismo correspondía a secuencias repetidas, mayoritariamente retrotrasposones y grandes familias multigénicas de proteínas de superficie, que incluyen transalidasas (TS) y proteínas tipo TS, mucinas, metaloproteasas y proteínas MASP (El-Sayed et al., 2005; Martínez-Calvillo et al., 2010; Pech-Canul et al., 2017). Desde ese entonces se han hecho esfuerzos por secuenciar otros genomas de la especie utilizando técnicas modernas que mejoraron el ensamblado (Berná et al., 2018; Wang et al., 2021).

*T. cruzi* presenta características particulares que lo diferencian del resto de los eucariotas, como ser su transcripción, estructura genómica y nuclear y organización de la cromatina (Schenkman et al., 2011). Los genes en el genoma de los tripanosomátidos están organizados en largos trectos de entre 10 y 100 genes codificantes co-orientados ubicados en tándem sobre la misma hebra, separados por regiones intergénicas relativamente cortas o nulas, los cuales se transcriben por la ARN polimerasa II dando lugar a grandes transcritos primarios policistrónicos. A pesar de que esta organización genómica recuerda a la estructura de los operones de procariontes, no se observan agrupaciones funcionales en los genes de un mismo policistrón (Martínez-Calvillo et al., 2010; Palenchar et al., 2006). Esta inusual organización genómica se suma al hecho de no haberse encontrado promotores canónicos para la polimerasa II y, parecerían ser la causa de que estos parásitos no presenten regulación canónica de la expresión génica a nivel de inicio de la transcripción, llevando a proponer la hipótesis de que la regulación génica estaría dándose mayoritariamente a nivel postranscripcional (Kramer, 2012; Lima et al., 2022). Estudios recientes del grupo de Da Cunha han demostrado que los distintos estados de la cromatina están asociados a distintos niveles de transcripción, donde se observó una correlación positiva entre la cromatina activa y los niveles de transcripción en estado estacionario abriendo nuevas posibilidades para los mecanismos regulatorios en *T. cruzi* (Lima et al., 2022). En este sentido trabajos recientes proponen que el compartimento genómico donde se ubican las familias multigénicas de proteínas de superficie puede estar regulado a nivel transcripcional mediante el control de grandes dominios de cromatina (Díaz-Viraqué et al., 2023).

Estos organismos, son capaces de adaptarse y proliferar en una serie de ambientes muy variados, enfrentando desafíos como cambios en la temperatura, en la disponibilidad de nutrientes, en la presencia de sistemas de defensa en el hospedero vertebrado, e incluso alternancia entre el medio extracelular y el intracelular. Por lo tanto, la modulación rápida de la expresión génica juega un rol preponderante en su capacidad a adaptarse y sobrevivir frente a situaciones adversas.

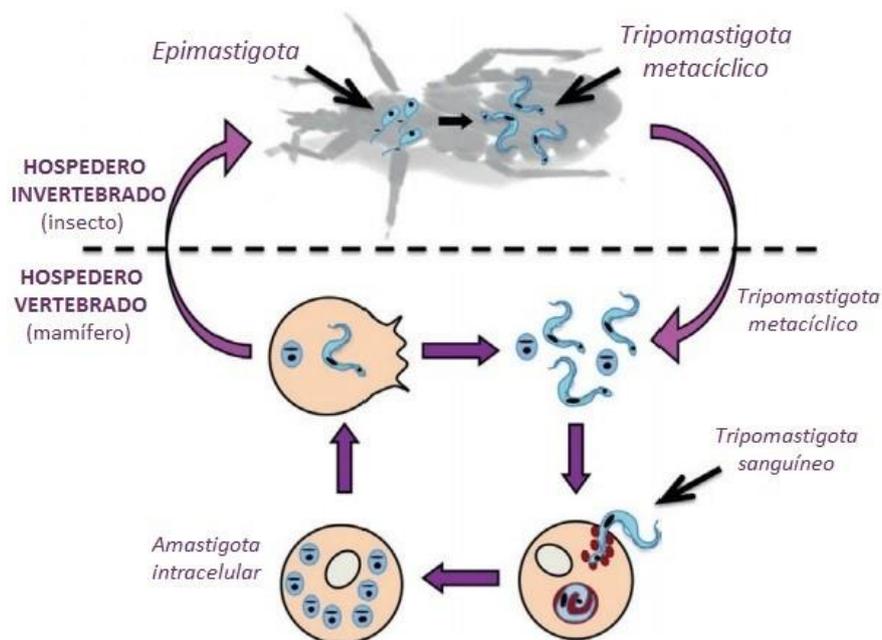
El procesamiento del transcripto primario de ARN, la exportación del ARN maduro al citosol, la estabilidad o degradación diferencial de los ARNs, la movilización a la fracción polisomal y la accesibilidad a la maquinaria de traducción de los transcriptos son todos eventos donde se puede regular la expresión génica de manera post-transcripcional que han sido descritos en estos organismos (Avila et al., 2003; Krieger et al., 1999). Se han reportado múltiples ejemplos de regulación post-transcripcional que resultan fundamentales en ciertos fenotipos o procesos celulares (Benabdellah et al., 2007; Clayton, 2013; da Silva Augusto et al., 2015; De Gaudenzi et al., 2013; De Gaudenzi et al., 2003; Duhagon et al., 2001; Iantorno et al., 2017; Inoue et al., 2002; Keene, 2007; Ouellette and Papadopoulou, 2009; Pastro et al., 2017; Perez-Diaz et al., 2013; Respuela et al., 2008; Siegel et al., 2009; Smircich et al., 2015; Thomas et al., 2009).

### 3.3 Ciclo de vida y biología celular de *T. cruzi*

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

El ciclo de vida comienza cuando el insecto vector ingiere tripomastigotas sanguíneos presentes en la sangre del hospedero mamífero infectado. Una vez ingeridos, la mayoría de los tripomastigotas mueren en el estómago del insecto, aquellos que logran sobrevivir luego de unos días se diferencian a la forma epimastigota no infectiva. Estos migran hacia el intestino donde comienzan a dividirse intensamente. En las regiones más posteriores del intestino delgado y el recto del vector, tiene lugar una nueva diferenciación (metaciclogénesis), donde los epimastigotas se diferencian a tripomastigotas metacíclicos infectivos no proliferativos. Estos tripomastigotas metacíclicos se liberan junto con las heces del insecto cuando el insecto vuelve

a alimentarse con sangre de un nuevo mamífero no infectado pudiendo llegar al torrente sanguíneo del mismo a través de la herida causada o a través de mucosas (de Souza et al., 2010). En el torrente sanguíneo del nuevo hospedero infectado, los tripomastigotas metacíclicos pueden ser internalizados por macrófagos pudiendo infectar además fibras cardíacas y de músculo liso. Los tripomastigotas son endocitados por las células con la formación de una vacuola parasitófora fusionada con lisosomas de la célula hospedera. Dentro de las dos horas posteriores a la infección, los tripomastigotas pueden abandonar el ambiente ácido del fagosoma antes de que se complete la diferenciación en amastigotas y entrar en el ambiente ligeramente alcalino del citoplasma, donde se multiplican como amastigotas aflagelados. Los amastigotas intracelulares proliferan activamente en el citoplasma y después de varias rondas de replicación, cuando se llega a un número crítico de parásitos intracelulares, se diferencian en tripomastigotas sanguíneos y ocurre la lisis celular. Al salir de la célula, los tripomastigotas derivados del tejido entran en el torrente sanguíneo y son capaces de infectar las células circundantes repitiendo los eventos intracelulares, o diseminarse a través del torrente sanguíneo pudiendo ser ingeridos por un insecto vector, completando el ciclo (Burleigh and Andrews, 1995; de Souza et al., 2010; Navarro et al., 2003) (Figura 1).



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

tripomastigotas y rompen la célula liberándose a la circulación del hospedero y diseminando la infección. Extraído y modificado de (Caradonna and Burleigh, 2011).

Por su parte, la biología celular del parásito presenta características particulares. *T. cruzi* posee una mitocondria única de gran tamaño que se extiende a lo largo del cuerpo celular. La matriz mitocondrial posee una región especializada formada por ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial, denominado kinetoplasto, el cual puede llegar a representar hasta el 25% del ADN total del parásito (Hoffmann, 2016; Shapiro and Englund, 1995). El complejo genoma mitocondrial consiste en un entramado de fibras de ADN circular concatenadas (Simpson, 1987), en las que se puede describir dos tipos de ADN circulares, maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos, que generalmente tienen 25 kb de extensión, codifican para genes mitocondriales como ARN ribosomales y proteínas de la cadena respiratoria. Los minicírculos, de aproximadamente 1 kb de largo, codifican para pequeños ARN no codificantes (ARN guías) que participan en el procesamiento de los transcritos mitocondriales (Aphasizhev and Aphasizheva, 2014).

Como se dijo con anterioridad, a lo largo del ciclo de vida complejo de *T. cruzi*, el parásito transita por al menos cuatro estadios metabólica y morfológicamente muy diferentes. Los distintos estadios han sido definidos inicialmente en base a sus características morfológicas. Durante el proceso de transición de un estadio al otro, el parásito exhibe cambios en el metabolismo y modificaciones profundas en morfología en cuanto al tamaño y forma celular, posición de núcleo y kinetoplasto, así como en la longitud del flagelo.

Mientras que epimastigotas son altamente activos en vías relacionadas al catabolismo y anabolismo, los tripomastigotas presentan bajos niveles de traducción general, conservando expresión especialmente de genes asociados a adherencia e infección celular (Smircich et al., 2015; Tonelli et al., 2011). Por otro lado, aunque los amastigotas sean metabólicamente más activos que los tripomastigotas, no tienen la versatilidad de respuesta frente a diferentes situaciones nutricionales (Berna et al., 2017).

Los epimastigotas tienen un tamaño que oscila entre 10 y 20  $\mu\text{m}$  de largo, pero a medida que viajan por el intestino del insecto crecen y aumentan 10  $\mu\text{m}$  en longitud. Allí es donde se diferencian a tripomastigotas metacíclicos alcanzando un tamaño de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de largo y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Si bien, desde el punto de vista parasitológico los tripomastigotas metacíclicos y los sanguíneos son casi indistinguibles morfológicamente y parecen compartir las mismas propiedades biológicas pues son capaces de interactuar e invadir la célula hospedera, existen diferencias a nivel de su biología molecular que permiten su identificación. Las formas

metacíclicas y las formas sanguíneas presentan antígenos específicos presentando además modos diferentes de interactuar con el hospedero. Los últimos están expuestos a las moléculas efectoras del sistema inmune del hospedero mamífero, incluyendo anticuerpos específicos. Estas formas celulares expresan en su superficie múltiples miembros de una gran familia de moléculas, las más caracterizadas son las mucinas y la superfamilia de las transialidasas (TcTS), asociadas a protección y evasión del sistema inmune del hospedero (Burleigh and Andrews, 1995; De Pablos and Osuna, 2012; Navarro et al., 2003).

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

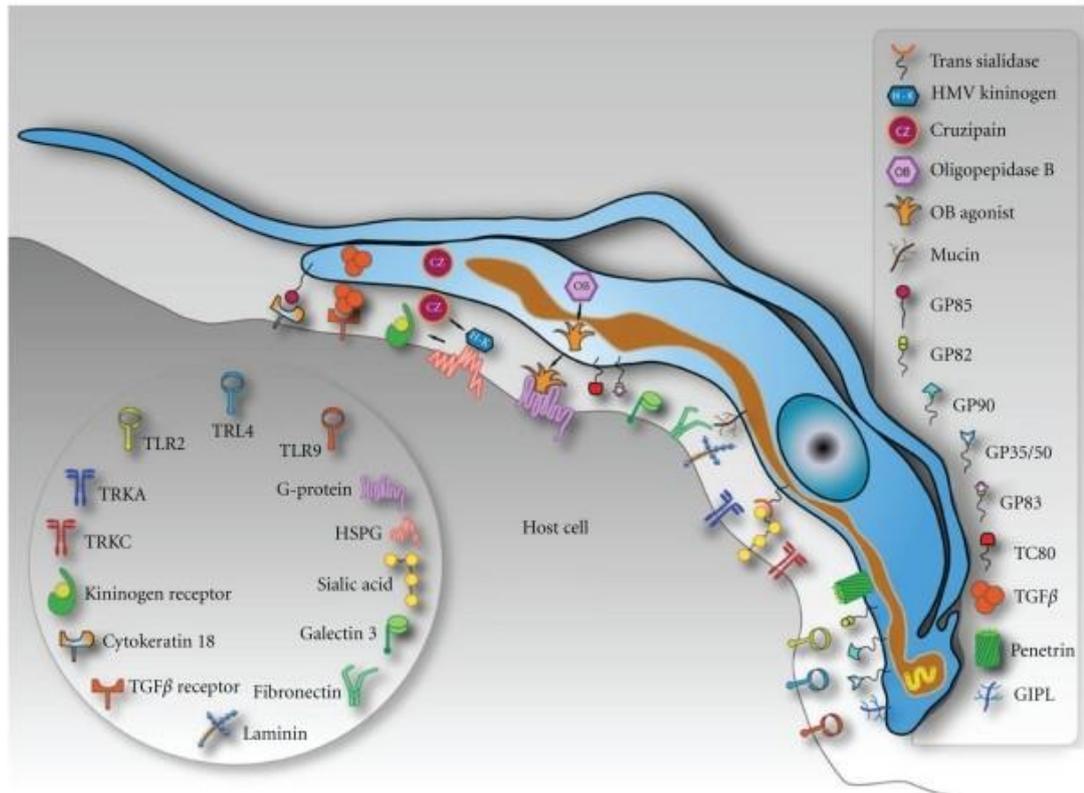
Las formas tripomastigotas de *T. cruzi*, y las formas epimastigotas, presentan un flagelo que está unido a lo largo del cuerpo celular. En tales casos, el dominio proximal del complejo *paraflagelar rod* (PFR) se une a través de filamentos a la cara interna de la membrana flagelar y luego a la zona de unión del flagelo (FAZ). El flagelo muestra un arreglo típico de nueve pares de dobletes de microtúbulos periféricos y un par central. Está bien establecido que el papel del flagelo en eucariotas es la movilidad celular, pero se hace cada vez más evidente su importancia en muchos otros aspectos de la biología celular, desde la señalización celular hasta la regulación del desarrollo. El PFR es una característica de todas las etapas del ciclo de vida de todos los kinetoplástidos estudiados hasta la fecha, con la excepción de las etapas amastigotas donde puede observarse un flagelo reducido, pero no emerge de la bolsa flagelar (Portman and Gull, 2010).

En las formas epimastigotas y amastigotas de *T. cruzi*, como en la mayoría de los tripanosomátidos, el ADN del kinetoplasto se encuentra estrechamente empaquetadas en una estructura compacta en forma de disco. Por el contrario, los tripomastigotas tienen un kinetoplasto redondeado, con una organización más relajada del ADN (Cavalcanti et al., 2009).

A diferencia del resto de los estadios, los amastigotas presentan un tamaño mucho menor, alcanzan un valor máximo de 5  $\mu\text{m}$  de largo. Además, son intracelulares y no tienen un flagelo protuberante. Poseen una forma redondeada u oval y su kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo. Más adelante (sección 4.5) se profundizará sobre particularidades de la biología de los amastigotas y el proceso de amastigogénesis.

### 3.4 Interacción hospedero-parásito y rol de las moléculas de superficie

La superficie celular de *T. cruzi* posee un denso glycocalix formado por un gran número de glicoproteínas, cuya mayoría están unidas a la membrana plasmática por glucosilfosfatidil inositol (GPI), que en cierta medida constituye un sello de identidad de estos parásitos (Morita et al., 2000). Estas proteínas de superficie pertenecen a varias familias multigénicas, producto de la expansión génica característica en estos parásitos (Berna et al., 2017). Se ha demostrado que las proteínas de membrana desempeñan un papel importante en la biología de *T. cruzi*, incluida la interacción entre el parásito y el hospedero, la resistencia al pH bajo en la vacuola parasitófora y la evasión del sistema inmune. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el cuerpo celular, el flagelo y el bolsillo flagelar de las diferentes formas durante desarrollo (Pech-Canul et al., 2017) e incluyen la superfamilia de las transilidasas (TcTS), mucinas (TcMUC) y MASP (proteína de superficie asociada a mucina) (de Souza et al., 2010; Freitas et al., 2011) (**Figura 2**).



**Figura 2** - Modelo esquemático donde se indican algunas moléculas involucradas en la interacción hospedero-parásito. Tomado de (de Souza, et al., 2010).

*T. cruzi* es incapaz de sintetizar monosacáridos de ácido siálico, por lo que se ve obligado a adquirirlo desde el huésped e incorporarlo en moléculas de su propia superficie de membrana. Se demostró que dos grupos de moléculas estaban implicados en este proceso, las transialidasas (TS) y las mucinas TcMUC (Frasch, 2000). Las transialidasas tienen la particularidad que, en lugar de hidrolizar el ácido siálico, pueden transferirlo de los sialoglicoconjugados en el hospedero a las terminales en los glicoconjugados del parásito. La función que desempeñan las TS es crucial en la patogénesis, porque la unión de ácido siálico a la superficie del parásito permite su evasión de la activación del complemento (Giorgi and de Lederkremer, 2011). Las TS son parte de una superfamilia altamente polimórfica, comprende al menos 1400 miembros en el genoma de CL Brener, de los cuales solo algunos presentan los residuos críticos para la actividad catalítica. Hasta el momento, 4 grupos han sido descritos basados en la similitud de secuencia y propiedades funcionales (Freitas et al., 2011). El grupo I contiene TS activas (TCNA y SAPA) y proteínas TS-epi expresadas en tripomastigotas y epimastigotas, respectivamente. Las del grupo II comprenden glicoproteínas de superficie gp85 implicadas en la invasión y adherencia en la célula huésped. Dentro del grupo III se destaca FL-160, una proteína completamente reguladora que inhibe las vías alternativa y clásica de activación del complemento. Por último, el grupo IV

de TS está compuesto por genes que codifican antígenos de superficie de tripomastigotas cuya función biológica aún se desconoce (Freitas et al., 2011; Pech-Canul et al., 2017).

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

El segundo grupo de moléculas implicadas en la incorporación del ácido siálico derivado del hospedero comprende glicoproteínas de tipo mucina (TcMUC), que son las principales receptoras del ácido siálico transferido por TS (Frasch, 2000). Las mucinas son los componentes más comúnmente expresados en la superficie de *T. cruzi* y son la tercera familia de genes más ampliamente expandida en el genoma, en el genoma de CL Brener comprende aproximadamente 863 genes (El-Sayed et al., 2005). Se trata de glicoproteínas que se encuentran muy O-glicosiladas con restos de azúcares unidos a residuos Ser/Thr. Tienen dos funciones esenciales: proteger al parásito de los mecanismos defensivos tanto del insecto como del hospedero mamífero, modulando así la respuesta inmune a lo largo del ciclo, y permitir la invasión en células y tejidos específicos (Buscaglia et al., 2006; Pech-Canul et al., 2017). Esto demuestran que las mucinas son importantes en las interacciones hospedero-parásito y que el ácido siálico de las mismas promueve la invasión celular por tripomastigotas en el torrente sanguíneo (Franchin et al., 1997). Además, las TcMUC podrían tener un papel en la resistencia del tripomastigota a la escisión de C3 convertasas en el complemento del suero humano (Tomlinson and Raper, 1998). Todos estos resultados indican que las mucinas de *T. cruzi* tienen un papel clave en interacciones célula-célula y protección frente a componentes presentes en el ambiente hostil al cual se encuentra sometido el parásito.

Esta superfamilia se divide en dos grandes grupos de genes, TcMUC y TcSMUG. La expresión de las TcMUC se restringe únicamente a los estadios desarrollados dentro del hospedero mamífero. Este grupo a su vez se encuentra dividido en 3 subgrupos de acuerdo al dominio central (TcMUC I – TcMUC II). TcMUC I es el componente principal en la forma amastigota, mientras que TcMUC II es predominante en las membranas lipídicas de tripomastigotas sanguíneos. La segunda subfamilia de mucinas, TcSMUG exhiben una variabilidad interna mucho menor que las otras dos familias, lo que puede explicarse por su expresión durante las etapas biológicas en el vector de insectos, donde están libres de la presión del sistema inmune (Buscaglia, 2003). Estas también se dividen en dos grupos pequeños de

proteínas: small (S) y large (L) de acuerdo al tamaño del mensajero que codifican (Pech-Canul et al., 2017). El grupo S es el principal aceptor de ácido siálico en la superficie del parásito por las transalidasas y se encuentra en las formas epimastigota y tripomastigota metacíclica. El grupo TcSMUG L, por el contrario, codifica para glicoconjugados de tipo mucina que no aceptan aceptores de ácido siálico y solo están presentes en la superficie epimastigotas (Pech-Canul et al., 2017).

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

El proceso de interacción entre *T. cruzi* y la célula hospedera se pueden dividir en tres etapas: adhesión y reconocimiento, señalización e invasión.

En el paso de adhesión está implicado el reconocimiento de moléculas presentes no solo en la superficie de las células del parásito, como las diversas glicoproteínas que fueron mencionadas anteriormente y distintas proteasas, sino también en el hospedero donde se destacan moléculas similares a lectinas, residuos de carbohidratos y distintas integrinas que funcionan como receptores (de Souza et al., 2010) (**Figura 2**).

Después de la unión y el reconocimiento del parásito por la superficie de la célula hospedera, tiene lugar una serie de procesos de señalización celular que culminan en la invasión (de Souza et al., 2010). En los momentos iniciales del reconocimiento, tanto en el parásito como en la célula hospedera, se produce un aumento transitorio de los niveles citoplasmáticos de calcio (Garzoni et al., 2003; Yoshida and Cortez, 2008).

La vía dependiente de los lisosomas se inicia mediante la exocitosis regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  dirigida de los lisosomas en la membrana plasmática. Otra vía utilizada para la internalización del parásito en las células no fagocíticas es la vía independiente del lisosoma. En este modelo,

los parásitos ingresan a las células a través de la invaginación de la membrana plasmática que acumulan PIP<sub>3</sub>, el principal producto de la activación de PI3K de clase I (de Souza et al., 2010).

En otro mecanismo conocido como endocitosis, se produce la participación de los filamentos de actina presentes. Se ha demostrado que los aumentos transitorios de calcio en el citoplasma de la célula hospedera, después de la interacción con tripomastigota, causan una reorganización del citoesqueleto de actina. Además, la despolimerización de los filamentos de actina en el sitio de entrada del parásito puede potenciar la invasión del parásito (Woolsey and Burleigh, 2004).

Muchas formas de vida han desarrollado mecanismos para resistir al desafío impuesto por las especies reactivas del oxígeno, o para utilizar estas especies con fines regulatorios o de señalización. Sumando particularidades a los tripanosomátidos, las vías que protegen del estrés oxidativo a estos parásitos difieren significativamente de aquella encontrada en mamíferos (Barrett et al., 2003). Durante la etapa aguda de la infección, los macrófagos residentes en la zona de la infección son invadidos por *T. cruzi*, el mecanismo por el que ocurre la infección de este tipo de fagocitos profesionales implica que el parásito debe sobrevivir y evadir el ambiente altamente oxidativo generado dentro del fagosoma para poder establecer la infección (Piacenza et al., 2013). Aunque se ha comprobado la ausencia en estos organismos de las principales defensas antioxidantes contra los radicales libres presentes en eucariotas, como los sistemas catalasa y glutatión peroxidasa, la evolución les ha dado a estos parásitos una amplia gama de otros sistemas enzimáticos. Entre ellos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) y otros tres sistemas dependientes de tripanotión [T(SH)<sub>2</sub>]: la triparedoxin peroxidasa, dos peroxidases independientes de selenio y la ascorbato hemoperoxidasa. Estos sistemas tienen la función de reducir al mínimo los efectos de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y garantizar el mantenimiento de un entorno intracelular reductor. De esta manera, se posibilita la supervivencia del parásito y su establecimiento en el nuevo hospedador (Hickson et al., 2022; Krauth-Siegel and Comini, 2008; Wilkinson and Kelly, 2003; Wilkinson et al., 2000). En estos últimos, el tripanotión cumple un rol central en el metabolismo redox, en donde constituye una compleja red dependiente fundamentalmente de tripanotión, aunque también están presentes otros tioles como la glutatiónil espermidina y el glutatión (Krauth-Siegel and Comini, 2008).

### 3.5 Generalidades de los amastigotas

Como se mencionó anteriormente, los amastigotas representan el único estadio intracelular y replicativo del parásito, y a diferencia del resto de los estadios, presentan un tamaño mucho menor, entre 1,5 y 5  $\mu\text{m}$  de largo. Poseen una forma redondeada u oval y su kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo. No suelen presentar flagelo, pero se ha visto la presencia de un pequeño flagelo protuberante.

Los parásitos con estadios intracelulares deben desarrollar mecanismos para poder sobrellevar los distintos ambientes que se enfrentan durante una infección, invadir, sobrevivir y proliferar dentro de una célula hospedera específica. Estos parásitos obligados suelen acoplar los procesos metabólicos del hospedero para satisfacer sus requerimientos nutricionales, a menudo modulando esas vías para facilitar el acceso a metabolitos importantes. Estas dependencias metabólicas aún no han sido bien caracterizadas para *T. cruzi* (Swann et al., 2015).

Estudios funcionales (Silber et al., 2009), datos de expresión (Li et al., 2016; Minning et al., 2009), proteómicos (Atwood et al., 2005) y ensayos metabólicos llevados a cabo en amastigotas celulares aislados (Rogerson and Gutteridge, 1980) proponen que los ácidos grasos y los aminoácidos son la fuente de carbono más probable para el metabolismo de los amastigotas. Se ha visto además que los transportadores de glucosa están regulados negativamente en amastigotas cuando son comparados con tripomastigotas. Asimismo, debido a que la glucosa es considerada un producto insignificante dentro de las células de mamífero, la hexosa como azúcar ha sido descartada como potencial fuente de carbono para estos parásitos (Atwood et al., 2005; Minning et al., 2009; Silber et al., 2009).

Sin embargo, se ha demostrado la habilidad de estos parásitos para acceder a los pools de hexosa del hospedero *in situ*. Esto es consistente con lo que ocurre en los amastigotas intracelulares, donde capitalizan la respuesta metabólica del hospedero para la infección, incluyendo el incremento en el consumo de glucosa para proveer de combustible en su propio metabolismo y replicación en el citosol del hospedero. Opuesto a la hipótesis establecida donde la glucosa no es accesible en el estadio intracelular de *T. cruzi*, Sheena Shah-Simpson y colaboradores proponen que la glucosa si es esencial para la sobrevivencia del parásito dentro de la célula. En este trabajo logran que el amastigota internalice un análogo de glucosa (2-deoxyglucose (2-DG)) *in situ*, el cual inhibe la glucólisis. El efecto inhibitorio con la restricción de glucosa extracelular sobre la proliferación fue ampliamente aumentado con la adición de este inhibidor de la vía metabólica de la glucosa. Mientras el crecimiento de los mismos no se ve

afectado por la disminución de la capacidad respiratoria del hospedero, la restricción de la glucosa extracelular si perjudicaría su proliferación (Shah-Simpson and Lentini, 2017).

Los tripanosomátidos tienen una vía glucolítica parcialmente compartimentada en organelos llamados glicosomas, quizás los peroxisomas más divergentes hasta ahora conocidos (Hannaert et al., 2003; Hannaert and Michels, 1994; Opperdoes and Borst, 1977; Parsons, 2004). Los glicosomas juegan un importante rol en la adaptación metabólica del parásito a los diferentes entornos a los que se expone durante su ciclo de vida. La glicólisis se organiza de tal forma que las siete enzimas que convierten la glucosa en 3-fosfoglicerato están dentro del glicosoma, mientras que las últimas tres se ubican en el citosol (Michels et al., 2000; Michels et al., 2005).

Asimismo, el crecimiento del parásito depende de la disponibilidad de cofactores derivados del hospedero y productos metabólicos. Los estudios de Cardonna y colaboradores indican que la deficiencia de la coenzima Q10 en el hospedero restringe el crecimiento de *T. cruzi* al limitar la disponibilidad de pirimidinas. Si bien *T. cruzi* tiene capacidad de sintetizar pirimidinas (Gutteridge and Gaborak, 1979), datos funcionales indican que los amastigotas intracelulares dependen de los pools de pirimidina del hospedero para apoyar su crecimiento (Caradonna et al., 2013). Por otro lado, al igual que otros parásitos protozoarios, *T. cruzi* es incapaz de sintetizar *de novo* purinas, dependiendo únicamente de la recuperación de estas preformadas para su desarrollo y proliferación (Berens et al., 1981; Nakajima-Shimada et al., 1996). La vía de rescate de purinas en *T. cruzi* incluye las siguientes enzimas relevantes desde el punto de vista quimioterapéutico: adenine phosphoribosyl transferase (APRT), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), adenosine kinase (AK), methylthioadenosine phosphorylase (MTAP), y nucleoside hydrolases (NHs) (Berg et al., 2010). Los parásitos recuperan la hipoxantina y la guanina con preferencia a la adenosina, que se convierten en IMP y GMP por la actividad enzimática de HGPRT (Berens et al., 1981). Además, la hipoxantina es la base de purinas más abundante en el suero humano. Así, el HGPRT juega un papel crucial en la supervivencia de los parásitos *T. cruzi*, lo que lo ha convertido en la diana elegida en la mayoría de los estudios realizados (Fernández et al., 2004; Freymann et al., 2000).

El AMP cíclico (AMPC) juega un papel primordial en el control de la diferenciación de los eucariotas inferiores. Las cantidades relativas de esta molécula pueden cambiar de acuerdo con el entorno circundante, lo que permite a los organismos adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones. El equilibrio diferencial de AMPC puede resultar en la activación de proteínas quinasas, transcripción de genes específicos y cambios en la estructura del citoesqueleto, que

en última instancia conducen a alteraciones celulares. *T. cruzi* está expuesto a diferentes condiciones ambientales durante todo su ciclo de vida, donde las concentraciones de AMPc son variables, y lo pueden llevar a experimentar cambios morfológicos y una expresión génica diferencial que le permitan al parásito pasar de un estadio a otro (Rangel-Aldao et al., 1987). Se ha visto que ya en etapas tempranas de la infección se observan indicadores de una reorganización en las vías de señalización (Li et al., 2016).

Estudios transcriptómicos revelaron genes co-regulados positivamente en estadios replicativos vinculados a la reparación del ADN, incluyendo el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), y una regulación negativa genes asociados al flagelo (Minning et al., 2009). Una división celular exitosa requiere de la coordinación oportuna y precisa de eventos que involucren tráfico cromosómico, citoesquelético y de membrana. Estos procesos están regulados por las acciones competitivas de quinasas y fosfatasas. El complejo cromosómico pasajero (CPC) es uno de los complejos heterotetraméricos más estudiados y altamente conservados. Aurora B es un componente esencial del complejo y representa una de las quinasas estudiadas más intensamente. Durante la mitosis, el CPC coordina distintos procesos como la alineación y segregación cromosómica adecuada, la modificación de histonas y la citocinesis (Keder and Carmena, 2013; Kitagawa and Lee, 2015). Se ha visto la existencia de homólogos a estos componentes en *Trypanosoma brucei*, y en total forman un complejo de 5 proteínas (CPC-TbTLK1-TbKIN-B) que desempeña un papel clave en la regulación de la segregación cromosómica en la fase temprana de la mitosis (Li et al., 2008).

### 3.6 Amastigogenesis intracelular y amastigogénesis axénica

La amastigogénesis ocurre en una primera instancia cuando los tripomastigotas metacíclicos presentes en las heces de triatomíneos se diferencian en amastigotas dentro de las células de los mamíferos, conocida como amastigogenesis primaria; y un proceso secundario cuando los tripomastigotas derivados del tejido infectado invaden nuevas células y se diferencian nuevamente a amastigotas, llamada comúnmente amastigogenesis secundaria (Navarro et al., 2003).

Dado que los amastigotas están en estrecho contacto con el hospedero al ser las únicas formas intracelulares, es de relevancia poder obtener estas formas en el laboratorio para realizar estudios que involucren preguntas relacionadas con la interacción hospedero patógeno, así como para estudiar factores involucrados en la invasión y mantenimiento de la enfermedad

o estudios de resistencia a diferentes drogas. Sin embargo, a pesar de su relevancia biológica, muchos esfuerzos de investigación se dirigen a estudiar la forma epimastigota dadas las dificultades que presenta el cultivo de formas intracelulares del parásito. Actualmente los protocolos de extracción y purificación de los amastigotas intracelulares siguen siendo largos y tediosos, a su vez suelen producir una muy baja tasa de rendimiento y al mismo tiempo aparecen contaminados con tripomastigotas o restos celulares.

Para mitigar esta dificultad, varios investigadores se han enfocado en obtener amastigotas en cultivo axénico a partir de tripomastigotas celulares o metacíclicos. Sin embargo, existe controversia de si los amastigotas axénicos son un buen modelo representativo de amastigotas intracelulares, ya que se han encontrado diferencias morfológicas, de crecimiento y en cuanto a diferentes características bioquímicas (Engel et al., 1987; Navarro et al., 2003; Takagi et al., 2019).

Para el caso de un organismo cercano como *Leishmania spp.*, la comunidad científica aún no ha alcanzado un consenso sólido en cuanto a la utilización de estos modelos axénicos, por lo que se recomienda ejercer un alto nivel de criterio en su utilización y precaución en la interpretación de resultados. Esto se debe a que los modelos axénicos actualmente disponibles aún no logran replicar completamente el entorno intracelular del parásito (Dias-Lopes et al., 2021).

Aunque se conocen las características básicas del proceso de amastigogénesis, todavía no están definidos en profundidad los mecanismos moleculares implicados (Hernandez-Osorio et al., 2010). Varios investigadores han estudiado algunos de los factores que representan estrés fisiológico para el parásito y han demostrado que la temperatura, las condiciones nutricionales y el pH estimulan la diferenciación durante la amastigogénesis (Contreras et al., 2002; Minning et al., 2003; Navarro et al., 2003; Tomlinson et al., 1995).

Los protocolos de obtención de amastigotas axénicos se vienen desarrollando hace más de 20 años. Ya en la década de los 80' Fernando Villalata y Felipe Kierszenbaum cultivaban amastigotas extracelulares, impulsados por la necesidad de aumentar el rendimiento de parásitos colectados en las infecciones e idealmente suplantar los tediosos procedimientos de purificación (Villalta and Kierszenbaum, 1982). Tiempo después Tomlinson y colaboradores describieron cambios morfológicos y ultraestructurales a lo largo del proceso de diferenciación (Tomlinson et al., 1995). Confirmaron mediante microscopía electrónica de transmisión (SEM) y análisis antigénico que la incubación de tripomastigotas derivados del cultivo tisular en medios ácidos a 37°C, aceleraba en gran medida la transformación morfológica, y que además también

promovía la adquisición y pérdida de antígenos específicos de membrana. El método consistía en incubar tripomastigotas celulares en DMEM que contiene 0,4% BSA (DMEM-BSA).

En 2002 el grupo de Contreras produjo amastigotas axénicos a partir de tripomastigotas metacíclicos y que además comprobaron que eran morfológica, biológica y antigénicamente similares a los amastigotas intracelulares (Contreras et al., 2002). Tanto esta última técnica de amastigogénesis axénica primaria como la de Tomlinson fueron tomadas e implementadas por Navarro, con la incorporación de MEMTAU como medio de incubación para la diferenciación secundaria (Navarro et al., 2003). Navarro además realizó una comparación morfológica de amastigotas a partir de tripomastigotas metacíclicos y celulares. El estudio demostró que incluso cuando los tripomastigotas metacíclicos y del torrente sanguíneo comparten ciertas propiedades biológicas y morfológicas, la amastigogénesis primaria y secundaria axénica aparentemente muestran diferentes procesos de desarrollo, lo que sugiere que sus mecanismos intracelulares que impulsan la diferenciación son diferentes.

Hernández-Osorio utilizó hgDMEM a diferentes pH y sin o con diferentes concentraciones de FBS para provocar la diferenciación de los tripomastigotas celulares bajo diferentes periodos de tiempo de incubación. Observaron finalmente que el cultivo sin suero a pH5 estimuló las tasas más altas de diferenciación en amastigotas. Bajo estas condiciones a las 12 hs post incubación se observó una diferenciación de la población completa (Hernandez-Osorio et al., 2010). El grupo de Chiribao empleó un método similar, incubando tripomastigotas recién liberados de células infectadas en medio DMEM a 37 °C bajo 5% de CO<sub>2</sub>. Observaron que después de 24hs de incubación, la población de parásitos consistió exclusivamente en amastigotas (Chiribao et al., 2012).

Hasta el momento los medios con tasas de diferenciación más eficientes coincidían en inducir la diferenciación bajo la privación de FBS durante la incubación. Sin embargo, recientemente Medina y colaboradores, con el fin de estudiar la infectividad de amastigotas extracelulares en macrófagos, generaron la diferenciación a partir de tripomastigotas celulares (derivados de células Vero) incubados en medio de triptosa de infusión hepática (LIT) a pH 5,8 y FBS al 10% durante 14 h (Medina et al., 2021).

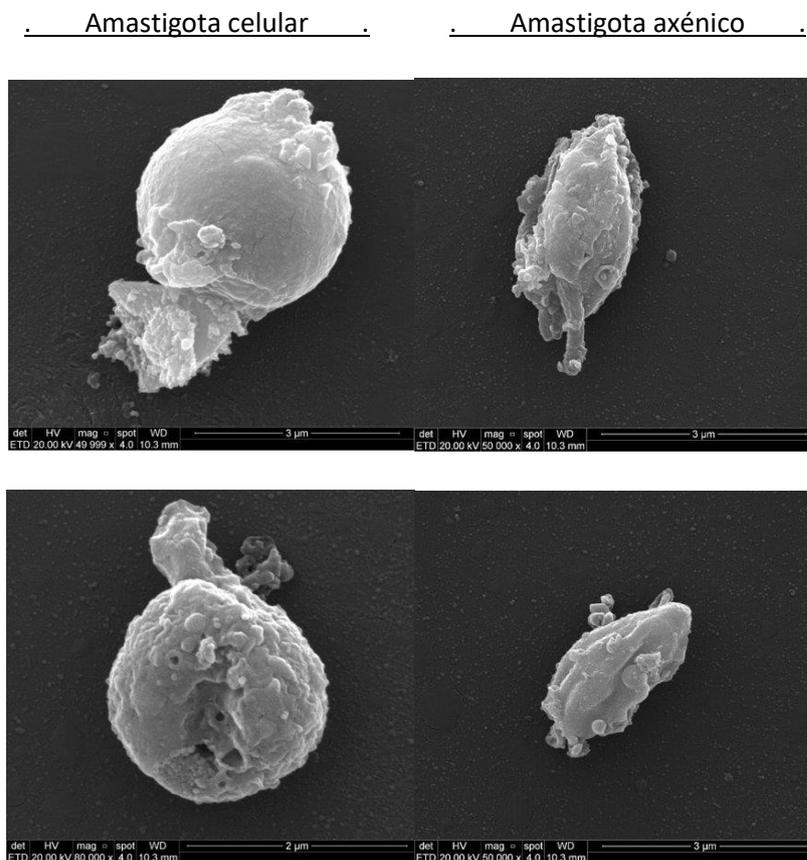
Analizando las distintas condiciones de amastigogénesis reportadas hasta el momento, para llevar adelante el presente trabajo decidimos combinar características de las distintas aproximaciones y generar una condición de diferenciación más simple, incubando durante 24 horas tripomastigotas en medio RPMI completo (10% FBS).

Hasta la fecha, no se han reportado análisis transcriptómicos comparativos profundos de amastigotas producidos de forma *in vitro* a partir de la diferenciación de tripomastigotas celulares o metacíclicos, con respecto al modelo intracelular. Este trabajo representa el primer análisis transcriptómico para la caracterización de un modelo axénico de amastigota.

## 4 Antecedentes

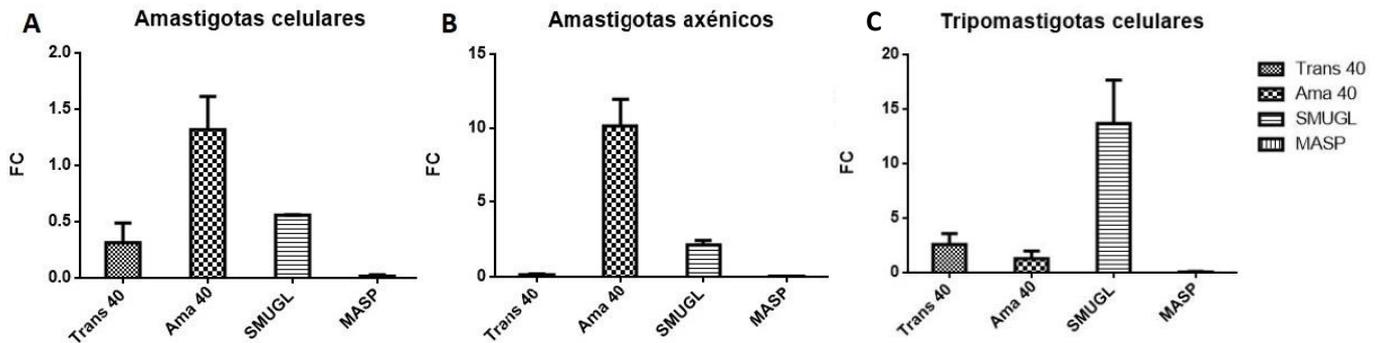
Este trabajo continúa con la línea de investigación de mi tesina de grado en donde se puso a punto y se estableció una infección de *T. cruzi* en células de mamífero. En dicho trabajo se realizó una primera caracterización del modelo de amastigota axénico basado en el propuesto por Hernandez-Osorio y colaboradores en 2010. En dicho trabajo se probaron distintas condiciones para inducir la diferenciación, diferentes combinaciones de hgDMEM alternando distintos pHs adicionando o no FBS a distintas concentraciones. Los tripomastigotas celulares derivados del cultivo de células fueron incubados en dichos medios a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los autores realizaron una caracterización molecular y morfológica de las distintas formas intermedias a distintas horas post incubación. Se observó que la incubación a 37°C en hgDMEM a pH 5 sin FBS induce la tasa de diferenciación más eficiente.

En este trabajo se propone un modelo simplificado al de Hernandez-Osorio y colaboradores a partir de la incubación de tripomastigotas celulares en RPMI complementado con 10% SBF por 24 hs. El modelo fue evaluado no solo a nivel morfológico sino también en función de la expresión de proteínas de superficie. Su morfología se determinó por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) donde se confirmó su forma redondeada-ovalada (**Figura 3**).



**Figura 3** - Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) para amastigotas celulares (izquierda) y amastigotas axénicas (derecha). Los métodos de obtención y purificación de estas muestras fueron los descritos en la sección Materiales y métodos.

Además, como marcadores moleculares de diferenciación se estudió comparativamente la expresión de algunas proteínas de superficie por PCR en tiempo real entre ambos modelos.



**Figura 4** - Expresión relativa a gapdh de los ARNm codificando para diferentes proteínas de superficie usadas como marcadores de los diferentes estadios (transialidasa 40, amastina 40, mucina TcSMUGL y proteína asociada a mucinas (MASP)). Se muestran los resultados para amastigotas celulares (A), y amastigotas axénicas (B) y tripomastigotas derivadas de células (C). Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes, cada uno realizado en replicas técnicas con su correspondiente desvío estándar.

Estos resultados fueron muy alentadores ya que se observa cómo, con respecto a GAPDH, las proteínas de superficie se expresan menos en amastigotas que en tripomastigotas y lo opuesto ocurre con amastina. Aunque los cambios observados difieren en magnitud, tanto amastigotas axénicas como amastigotas celulares presentaban cambios de expresión consistentes con el estadio (**Figura 4**).

Los resultados nos motivaron a continuar con el estudio de este modelo axénico comparando y analizando los perfiles de expresión génica de mediante RNA-Seq. Se espera de esta manera, aportar datos en una temática que genera controversia en la comunidad científica los cuales podrán ser usados por ésta para la toma de decisiones al momento de planificar estrategias experimentales.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Estudiar a nivel molecular la validez del modelo de amastigotas axénicos mediante la comparación de su transcriptoma con el obtenido a partir de amastigotas celulares. Se propone analizar y comparar el perfil de expresión génica de amastigotas axénicos con el de amastigotas celulares mediante RNA-Seq.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Obtención de ARN total de tripomastigotas celulares, amastigotas intracelulares y amastigotas axénicos.
2. Obtención de perfiles de expresión génica a nivel global por RNA-Seq
3. Búsqueda de ARNs y vías de expresión diferencial en amastigotas axénicos versus amastigotas celulares.
4. Asociar las vías y genes diferenciales con la biología del estadio amastigotas de *T. cruzi*

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Medios de cultivo y soluciones utilizadas

Para el crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* se utilizó el medio de cultivo Brain-Heart Infusion-Tryptose (BHI): 33 g BHI, 3 g triptosa, 4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 g KCl, 0.3 g glucosa, 0.25 g/L hemina, 990 mL H<sub>2</sub>O. La esterilización se realizó por autoclavado durante 20 minutos a 121 °C. Se le adicionó además penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 µg/mL) y 10% de suero fetal bovino (SFB) tratado 15 minutos a 65°C para la inactivación del complemento.

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

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

### 6.2 Cultivo de diferentes formas de *T. cruzi*

#### 6.2.1 Cultivo de epimastigotas

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

#### 6.2.2 Cultivo de células de mamífero

Para el cultivo de células de mamífero, se dispuso de células VERO CCL-81 (línea celular proveniente de tejido renal derivado de un mono verde africano adulto) las cuales fueron mantenidas en medio RPMI completo anteriormente descrito, e incubadas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (Batista, 2015). El cultivo en confluencia fue lavado con PBS 1X, tripsinizado, diluido y nuevamente sembrado para su mantenimiento.

#### 6.2.3 Infección de células de mamífero (infección primaria)

Para las infecciones de células VERO se utilizaron parásitos obtenidos de cultivos de epimastigotas sujetos a estrés nutricional (fase estacionaria de al menos 20 días). Se dispuso de un cultivo de células VERO crecidas en monocapa (50% confluencia) y se infectaron con parásitos en una razón de al menos 100 parásitos/célula. Se retiró el medio luego de las 24 hs, se lavó con PBS y se colocó medio RPMI completo nuevo.

#### 6.2.4 Infección de células de mamífero con tripomastigotas celulares (infección secundaria)

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

Se infectaron las células VERO con tripomastigotas celulares previamente purificados en una razón de al menos 10 parásitos/célula (Batista, 2015). A las 24 hs PI, se retiró el medio, se lavó con PBS 1X y se colocó medio RPMI completo fresco.

### 6.3 Obtención de las distintas muestras

#### 6.3.1 Extracción de amastigotas intracelulares

Para obtener el perfil de expresión génica de los amastigotas intracelulares, se implementó la técnica *Dual RNA-Seq* (Li et al., 2016; Westermann and Vogel, 2018). La misma consiste en la extracción y el posterior secuenciado del ARN total de la célula infectada, conteniendo ARN del parásito y ARN de la célula hospedera. De esta manera se simplifica el protocolo al evitar la purificación de los parásitos intracelulares, lo cual no solo es tedioso, sino que además puede llevar cambios en la expresión génica de los amastigotas. Las herramientas bioinformáticas permiten luego filtrar aquellas lecturas que provengan de *T. cruzi*.

Brevemente, se lavó una infección de células VERO con *T. cruzi* a las 72 hs PI 2 veces con PBS 1X y se tripsinizó. Luego se centrifugó a 1.500 g por 10 minutos y se resuspendió en 1 mL de Trizol para posterior extracción de ARN. El procedimiento se realizó por triplicado.

### 6.3.2 Obtención y purificación de tripomastigotas celulares

Se lavó una monocapa de células VERO infectadas con PBS 1X previo a la salida de los tripomastigotas celulares (5 días PI) y se colectó cuidadosamente el sobrenadante conteniendo los tripomastigotas, sin distorsionar ni “barrer” la monocapa de células. Los amastigotas extracelulares (EAs) contaminantes suelen quedarse adheridos a las células de la monocapa, y al tomar muy delicadamente el sobrenadante se evita arrastrarlos y llevarlos junto con los tripomastigotas. Luego ese sobrenadante se centrifugó a alta velocidad (4000xg por 10 minutos a 4°C) para coleccionar en el *pellet* los tripomastigotas celulares.

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

Los amastigotas axénicos fueron obtenidos por amastigogénesis *in vitro* mediante una modificación al método de Hernández-Osorio y Medina (Hernández-Osorio et al., 2010; Medina et al., 2021). Brevemente, se incubaron tripomastigotas celulares en RMPI completo a 37 °C durante 24 hs. Posteriormente, se centrifugó a 3.000 g por 10 minutos y se incubó a 37 °C durante 2 hs. Se resuspendió el *pellet*, conteniendo los amastigotas axénicos purificados en 1 mL de PBS 1X, luego se centrifugó nuevamente a 3.000 g por 10 minutos y se resuspendió en 1 mL de Trizol para posterior extracción de ARN. El procedimiento se realizó por triplicado.

## 6.4 Extracción de ARN y evaluación de calidad

Para la extracción de ARN se siguió el protocolo TRIzol™ Reagent (Invitrogen) indicado por el fabricante, y para las tres muestras (tripomastigotas celulares, amastigotas intracelulares y amastigotas axénicos) se procedió de la misma forma. Brevemente, se tomó una concentración de  $2 \times 10^7$  parásitos solubilizados en 1 mL de Trizol, provocando así la lisis celular. Se agregó cloroformo separándose la mezcla en dos fases, una orgánica conteniendo las proteínas y, otra acuosa conteniendo el ARN. Se aisló la fase acuosa y se precipitó el ARN con isopropanol. Finalmente, el ARN se lavó con etanol 75% y se solubilizó en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. La extracción se realizó a para 3 muestras biológicas en los 3 modelos celulares.

Para eliminar las trazas de ADN del ARN extraído, las muestras se trataron con el kit DNasefree (*Thermo Fisher Scientific*), según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se trató el ARN con Tampón de DNase I y DNase I y posteriormente se agregó un inactivador de la enzima, el cual por centrifugación permitió obtener el ARN aislado en la fase acuosa.

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

## 6.5 Retrotranscripción del ARNm y PCR en tiempo real

Para la evaluación de los distintos protocolos de amastigogenesis axénica (6.8 - Búsqueda de genes de expresión diferencial) se estudió la expresión de distintos genes por qRT-PCR. Los primers fueron diseñados usando la herramienta online Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

La generación del ADN copia (cDNA) se llevó a cabo usando *SensiFAST cDNA Synthesis Kit* (BIO-65054) que contiene una mezcla particular de hexámeros al azar y oligo-dT como cebadores. Brevemente, se mezcló 1 µg de ARN molde (previamente tratado con DNAsa (utilizando *TURBO DNA-free™ Kit*)) con 4 µL de tampón de reacción 5x TransAmp Buffer para la transcriptasa reversa y 1 µL de la enzima, llegando un volumen final de 20 µL. Se incubó dicha mezcla durante 10 minutos a 25 °C, 15 minutos a 41°C y 5 minutos a 85°C.

La evaluación de la expresión de estos genes seleccionados (**Anexo Tabla 1**) por qRT-PCR se determinó usando *SensiFAST SYBR Hi-Rox Kit* (*Bioline*). Dicho kit contiene la sonda fluorescente SYBR Green, *hot start* DNA polimerasa, el tampón específico y los dNTPs necesarios para la reacción. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen final de 10 µL conteniendo los cebadores en una concentración final de 0,4 µM. El primer paso de la reacción es una incubación a 95°C durante 10 minutos para activar la polimerasa, y luego 40 ciclos a 95°C por 15 segundos para desnaturalizar las hebras seguido de 1 minuto a 60°C para la hibridación de los cebadores. Las reacciones se llevaron a cabo en un *BIO-RAD CFX96 Real Time PCR* y los datos obtenidos fueron procesados con *CFX Manager™ Software*.

## 6.6 Secuenciación y tratamiento inicial de los datos

Las muestras fueron enviadas para su secuenciación en la plataforma HiSeq 2000 (Illumina®), servicio prestado por la empresa Macrogen, Korea. Las librerías fueron construidas por el mismo Servicio de secuenciación usando TruSeq RNA Sample Prep Kit v2.

Los datos crudos de secuenciación fueron procesados de acuerdo con protocolos estándares de análisis. La calidad de las lecturas obtenidas se evaluó por FastQC, el procesamiento inicial y el filtrado de estas se realizó con trim\_galore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>). Para el filtrado de lecturas se utilizó `--length 30`, eliminando aquellas lecturas que tuviesen un tamaño menor a 30 pb luego del *trimeado* por calidad y `--phred33 20`.

## 6.7 Obtención de lecturas para análisis de niveles de expresión

HISAT2 (Kim et al., 2015) se utilizó para alinear las lecturas previamente filtradas con el genoma de referencia CL-Brener (haplotipo Esmeraldo-Like, *release 39* descargado de TriTrypDB) y la herramienta samtools para ordenar e indexar el mapeado. Las lecturas mapeadas por gen fueron contadas utilizando HTSeq-count (<https://github.com/genepattern/HTSeq.Count>) (Anders et al., 2015), utilizando como carácter de conteo los genes (`feature type CDS, -t gene`). Como nuestros datos de RNA-Seq no se hicieron con un protocolo de hebra específica, para el conteo se utilizó la opción `--stranded=no`. El resto de los parámetros fueron utilizados por defecto. El programa necesita como archivos de entrada: el mapeo generado por HISAT2 (*.sam/.bam*) y el archivo de anotación del genoma (*.gff*). Finalmente, construyó una tabla con los identificadores de cada uno de los genes (ID, filas) y el número de lecturas mapeadas sobre cada gen (columnas).

## 6.8 Búsqueda de genes de expresión diferencial

El análisis estadístico y la búsqueda de genes expresados diferencialmente se llevó a cabo con el paquete de R/Bioconductor, DESeq2. Para trabajar en este programa se preparó la tabla de entrada, que en este caso consiste en los ID (filas) y los conteos de lecturas por gen (columnas) para cada condición y réplica. Una vez en R, se creó otra tabla de referencia especificando la condición asignada a cada columna de la tabla anterior. Luego, se calcularon los factores de normalización que el DESeq2 utiliza para ajustar las distintas réplicas y condiciones

para que las mismas se vuelvan comparables. Los valores normalizados fueron ajustados a un modelo de distribución binomial negativa que permite la comparación de estos entre las condiciones estudiadas. De esta manera se obtuvieron los siguientes valores para cada gen: el cambio en el nivel de expresión entre dos condiciones expresado en logaritmo en base dos del *Fold Change* ( $\log_2FC$ ), el *pval* que representa el p-valor de la significancia estadística de dicho cambio, y el *padj*, que es el p-valor ajustado para múltiples pruebas usando la corrección de Benjamini-Hochberg (*False discovery rate*; FDR).

## 6.9 Análisis funcional

Para la identificación de los transcriptos obtenidos se buscó su clasificación respecto a su patrón de expresión y funcionalidad utilizando herramientas públicas de análisis de enriquecimiento funcional. Existen varias herramientas desarrolladas para el análisis de listas de genes expresados diferencialmente. En este trabajo se utilizaron herramientas disponibles en la base de datos de tripanosomatidos TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>) A partir de las listas de genes diferencialmente expresados se obtuvieron los términos GO y KEGG más enriquecidos con un p-valor menor a 0,05.

## 7 Resultados y discusión

### 7.1 Obtención y evaluación de muestras para secuenciar

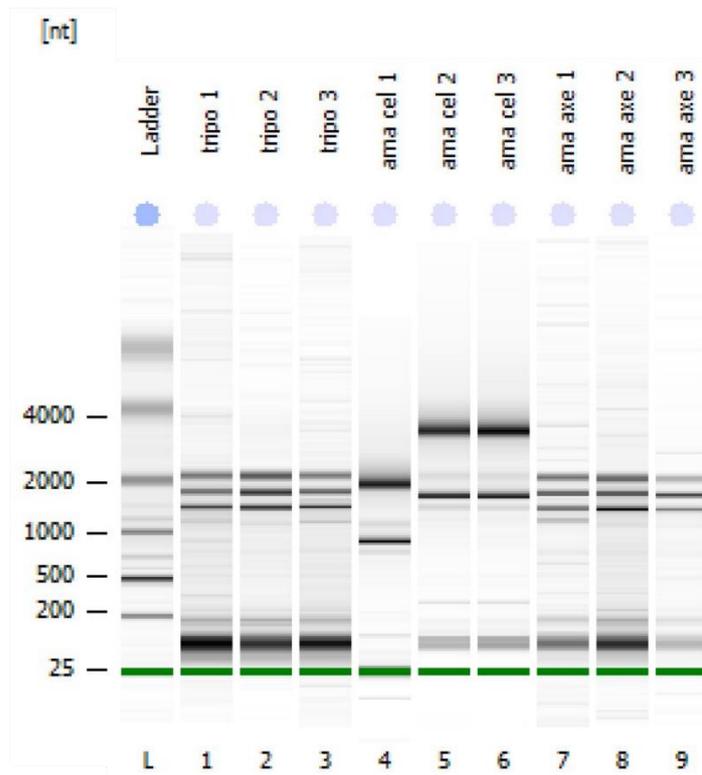
Luego de infectar una monocapa de células de mamífero VERO con un cultivo de epimastigotas de *T. cruzi* sometido a estrés nutricional por ~20 días y realizar sucesivas infecciones con tripomastigotas celulares, se logró establecer una infección estable de células VERO con *T. cruzi*.

Habiendo logrado establecer una infección de *T. cruzi* en células de mamífero, para cumplir con el Objetivo específico 1, se extrajo ARN total según protocolo TRIzol™ Reagent (Invitrogen), detallado en Materiales y métodos, a partir de tripomastigotas celulares, amastigotas axénicos y amastigotas celulares. La metodología de obtención y purificación de las muestras también se detalla en Materiales y métodos.

Se decidió incorporar al estudio la muestra de tripomastigotas celulares, con el fin de mejorar la comparación posterior en el análisis estudiando así el proceso de diferenciación desde tripomastigota hacia cada modelo de amastigota.

#### - Cantidad y calidad de los ARNs obtenidos

Una vez obtenido el ARN purificado, se procedió a evaluar su integridad y cantidad. La calidad de las muestras de ARN es fundamental en el contexto de los análisis de expresión génica, en particular mediante RNA-Seq. La cantidad e integridad del ARN total extraído con Trizol y tratado con ADNsa fue analizada en un Agilent 2100 Bioanalyzer, empleándose un Agilent RNA 6000 Nano Chip (Agilent) (**Figura 5**). El valor del número de integridad del ARN (RIN) facilita la determinación objetiva de la calidad del RNA que se utilizará en experimentos posteriores. Este valor va desde el 1 al 10 y se basa, entre otras características, en la cuantificación de productos de degradación del ARN a lo largo de toda su migración electroforética. Entre ellas se destaca la relación de los ARN ribosomales 18S y 28S, que se encuentran en muestras de ARN eucariota. En este caso, si bien *T. cruzi* es un organismo eucariota, sus características ancestrales lo diferencian en ciertos aspectos de su biología molecular, como la presencia de ARNr de tamaños diferentes a los hallados en otros eucariotas. Por este motivo, el valor RIN calculado de forma automática por el software del equipo no es cercano a 10, a pesar de que los electroferogramas obtenidos muestran un ARN integro y de buena calidad (**Figura 5, Anexo Figura 1**)



**Figura 5** - Control de calidad de las muestras de ARN total. Fueron corridas en un Chip RNA Nano 6000 (Agilent 2100 Bioanalyzer). Para todas las muestras se observan las tres bandas correspondientes a los ARN ribosomales a la altura de 2000 pb. Detalle de los carriles, de izquierda a derecha: MPM, tripomastigota 1,2 y3; amastigota celular 1,2 y 3; amastigota axénico 1,2 y 3. El desfase del carril 4 es un error en el software de análisis del equipo, el cual detecta de forma incorrecta el pico correspondiente al marcador de bajo peso molecular (verde). Esto no está asociado a la calidad de las muestras.

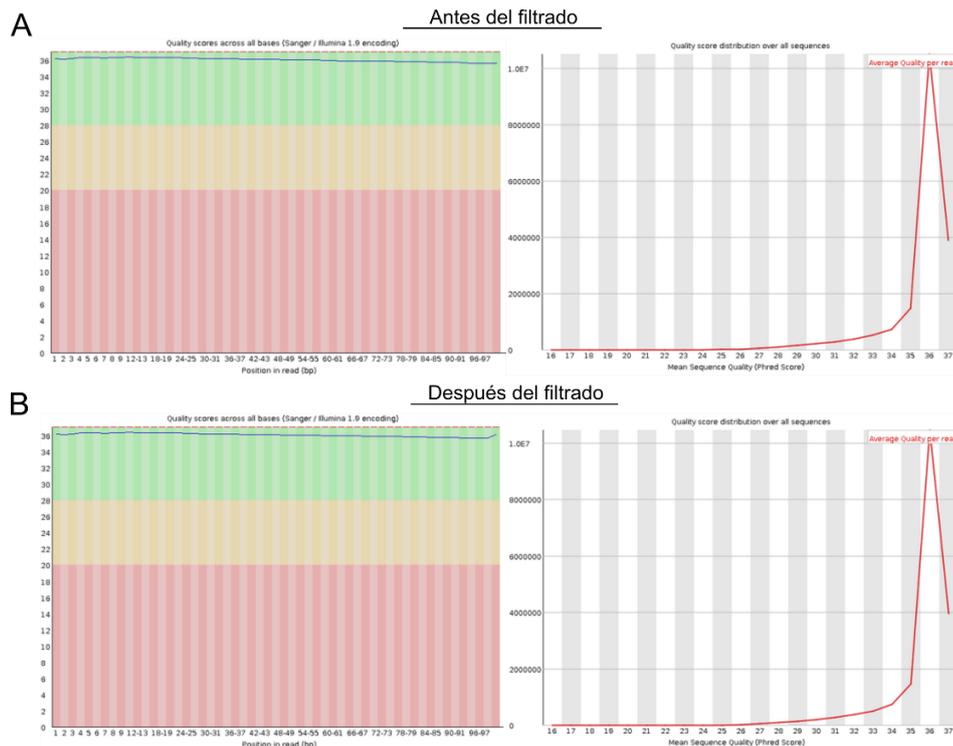
Asimismo, se distinguen en mayor medida los ribosomales de mamífero correspondiente a las células VERO en las muestras de amastigotas celulares (carriles 4, 5 y 6), como es de esperar, y en menor medida los ribosomales esperados de *T. cruzi*.

El ARN extraído tuvo una concentración aproximada de 150 ng/μL para tripomastigotas y amastigotas axénicos, y ~900 ng/uL para amastigotas celulares. La integridad del ARN de todas las muestras fue adecuada para superar el control de calidad y proceder a la secuenciación de fragmentos pareados en un secuenciador Hiseq2000. Las bibliotecas y la secuenciación de las muestras fueron realizadas usando el servicio de la compañía Macrogen.

## 7.2 Evaluación de calidad y tratamiento de los datos

Una vez obtenidos los datos de RNA-Seq crudos, estos se procesaron de acuerdo con protocolos estándares de análisis. Para cumplir con el Objetivos específicos 2, primero se

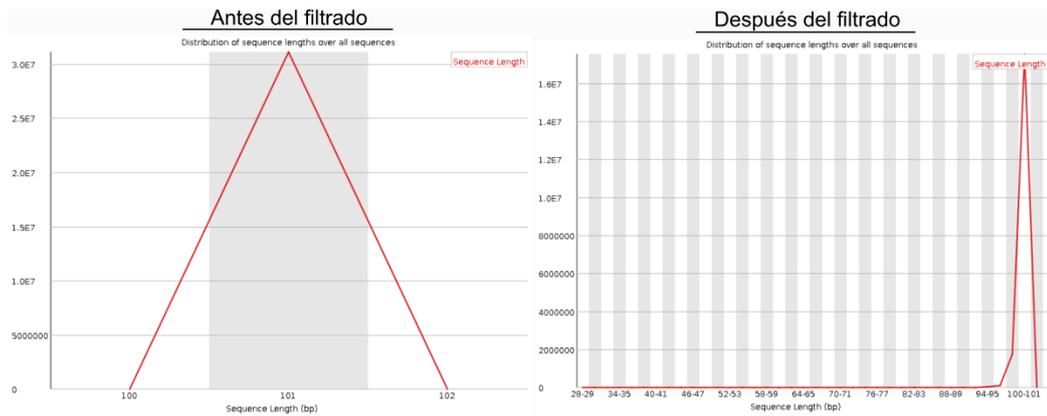
procedió a realizar una evaluación de la calidad de la secuenciación y un tratamiento inicial de los datos. Se obtuvo un número considerable de lecturas en la corrida, entre 40 y 70 millones de lecturas por muestra, las cuales fueron evaluadas utilizando FastQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) (**Figura 6A**). Dicho programa aporta diversos gráficos relacionados a la calidad y características generales de las lecturas obtenidas. Se removieron aquellas lecturas demasiado cortas o de baja calidad utilizando *trim\_galore* (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>), así como también posibles adaptadores que hayan quedado debido al proceso de secuenciación.



**Figura 6** - Representación gráfica de la calidad de las lecturas por FastQC. **A.** Antes del procesamiento. **B.** Después del procesamiento por *trim\_galore*. La región verde indica los mejores valores de calidad, los cuales decrecen de amarillo a rojo (figuras a la izquierda).

Luego del tratamiento de las secuencias, se corrió nuevamente el FastQC para verificar la calidad de las secuencias procesadas (**Figura 6B**). Este procesamiento generó pocos cambios en las lecturas, lo cual es esperado considerando la buena calidad inicial de las mismas. De todas formas, se filtraron algunas lecturas de mala calidad,  $\sim 4.700$  en promedio para todas las muestras y se continuó trabajando con estas últimas.

Asimismo, luego de este primer filtrado por calidad, podemos ver como el procesamiento cambia sutilmente el largo de las lecturas. En promedio se reducen  $\sim 10\text{pb}$  (**Figura 7**).



**Figura 7** – Distribución del largo de las lecturas en pares de bases, antes del procesamiento (izquierda) y luego del procesamiento (derecha).

### 7.3 Perfiles globales de expresión génica

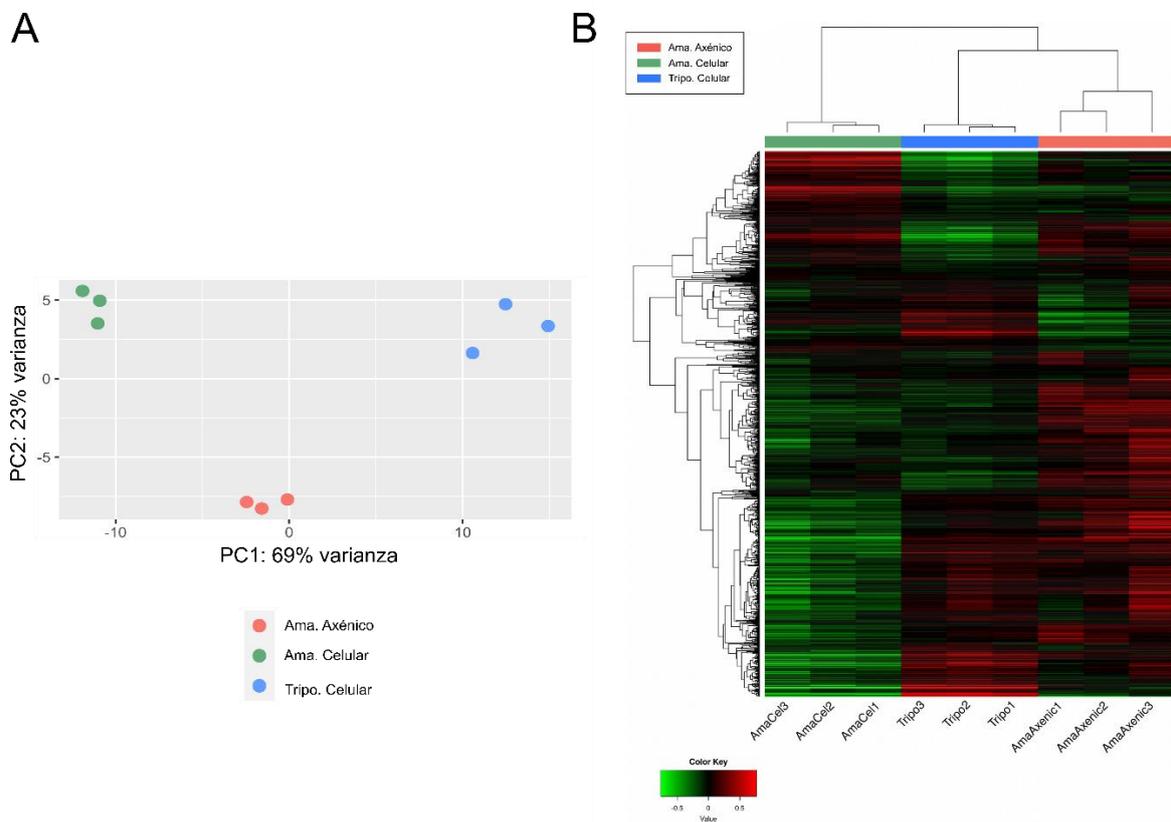
Una vez procesadas las lecturas crudas, se procedió a realizar el mapeo de las lecturas filtradas sobre el genoma de referencia disponible en el momento de la realización de este paso de análisis (CL Brener). Se indexaron ambos haplotipos Esmeraldo-like y Non-Esmeraldo-Like, y se mapearon las lecturas contra el genoma concatenado utilizando HISAT2. Los porcentajes de mapeo resultantes fueron los esperados, donde amastigotas axénicos y tripomastigotas celulares presentan un mayor porcentaje de mapeo (~90%) en comparación con los amastigotas celulares (~18%) (**Tabla 1**). Esto es producto del procedimiento de la técnica *Dual RNA-Seq*, donde se extrae ARN total de la célula infectada. Por consiguiente, en la muestra se encuentra la presencia de ARN del parásito, y en mayor proporción ARN de la célula hospedera. Valores similares han sido reportados por otros grupos de investigación (Li et al., 2016).

CL-Brener		
muestra	%mapeo (%)	#lecturas mapeadas
Tripomastigota 1	91,3	17.191.895
Tripomastigota 2	90,8	14.461.603
Tripomastigota 3	91,2	13.789.438
Ama. Celular 1	18,3	6.698.321
Ama. Celular 2	18,4	5.687.136
Ama. Celular 3	17,8	6.148.428
Ama. Axénico 1	91,3	15.277.328
Ama. Axénico 2	91,6	17.965.453
Ama. Axénico 3	92,3	23.131.932

**Tabla 1** - Lecturas mapeadas al genoma de referencia CL-Brener para las distintas muestras

Para el conteo de las lecturas mapeadas se utilizó HTSeq-count (Anders et al., 2015), que permite obtener una tabla que contiene los IDs de los genes y el correspondiente número de lecturas mapeadas, para la posterior búsqueda de genes diferenciales. Para este conteo se utilizó el archivo de anotación correspondiente al haplotipo Esmeraldo-like y se contabilizaron las lecturas mapeadas en regiones codificantes (CDS).

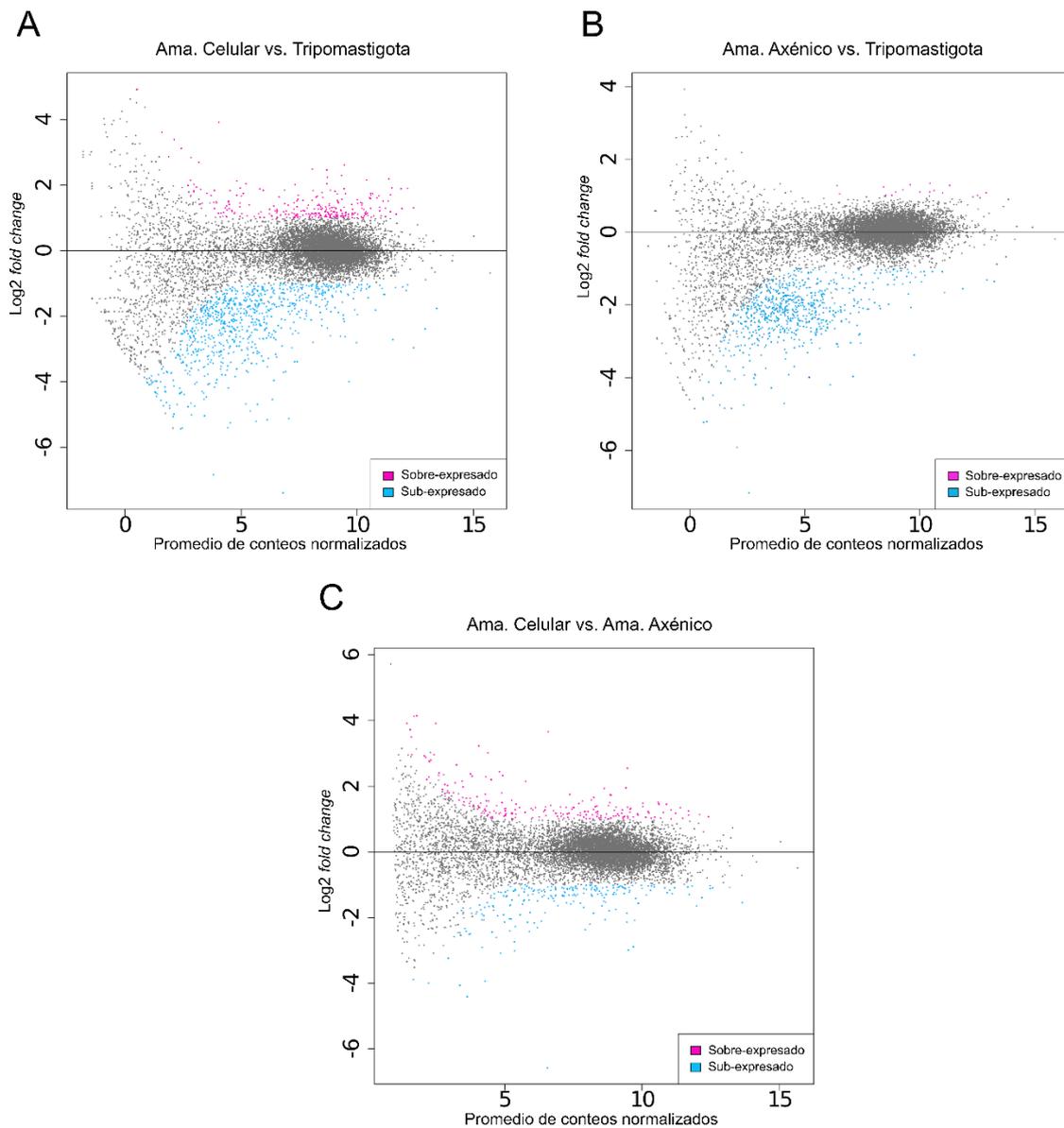
El análisis de expresión génica diferencial se llevó a cabo con el paquete de R/Bioconductor, DESeq2, el cual calcula los factores de normalización para ajustar las distintas réplicas y condiciones para que las mismas se vuelvan comparables. Luego de filtrar genes con bajo número de lecturas (<1 lectura normalizada/CDS) en todas las condiciones la lista final cuenta con ~9.800 genes los cuales fueron usados para análisis posteriores.



**Figura 8** – Visualización global de los datos. **A.** Análisis de componentes principales. **B.** Agrupamiento jerárquico de las muestras.

Con el fin de identificar tendencias globales de los datos, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) permitiendo obtener una representación de las distancias relativas entre las distribuciones de las diferentes muestras (**Figura 8A**). Por otra parte, se realizó

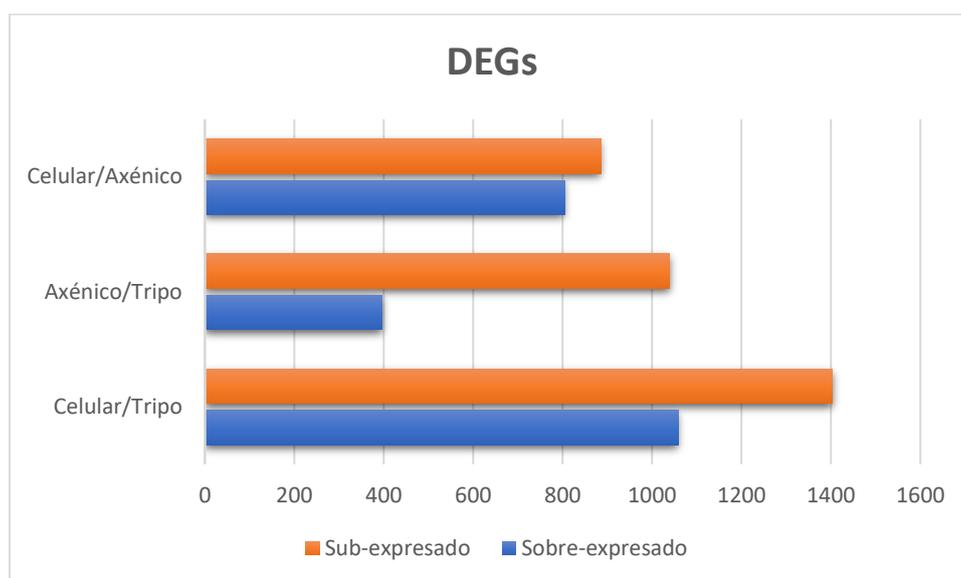
un análisis de agrupamiento jerárquico cuyo resultado se muestra como un *heatmap* en la **Figura 8B**. En cuanto a las réplicas biológicas, el PCA revela que las mismas se agrupan bien entre ellas, identificándose claramente tres poblaciones diferentes (**Figura 8A**). Aunque el PCA muestra que los 3 grupos están aproximadamente equidistantes entre sí, en el *heatmap* se observa que los amastigotas axénicos se agrupan con los tripomastigotas celulares (**Figura 8B**).



**Figura 9** - Visualización de la expresión génica diferencial global para todas las comparaciones. En el eje Y se representa el  $\log_2$  de la tasa de cambio ( $\log_2FC$ ) y en el eje X se representa la media de los conteos normalizados. Los puntos coloreados representan genes con un  $p\text{-adj} < 0.05$  y  $FC \geq 1,5$  (rosado) o  $FC \leq 0,67$  (celeste) **A.** Amastigota Celular vs. Tripomastigota Celular. **B.** Amastigota Axénico vs. Tripomastigota Celular o. **C.** Amastigota Celular vs. Amastigota Axénico.

Se identificaron aquellos genes diferencialmente expresados (DEGs) con un  $FC \geq 1,5$  y  $\leq 0,67$ ; además de tener un  $FDR < 0,05$  para todas las comparaciones. La **Figura 9** muestra un gráfico MA, que representa la tasa de cambio entre las condiciones (como  $\log_2FC$ , eje y) y la media de la expresión en los conteos normalizados (eje x) para cada gen. Si bien ambos amastigotas cuando son comparados con tripomastigotas presentan un perfil similar, en donde se observa un mayor número de genes regulados negativamente en comparación con aquellos regulados positivamente, se puede observar que el número de genes sobreexpresados aumenta para la comparación de los amastigotas celulares. Además, la magnitud en los cambios de expresión de ambas comparaciones es mayor para los genes regulados negativamente (**Figura 9A y Figura 9B**).

El número de genes identificados como diferenciales en las comparaciones se muestra en la **Figura 10**.

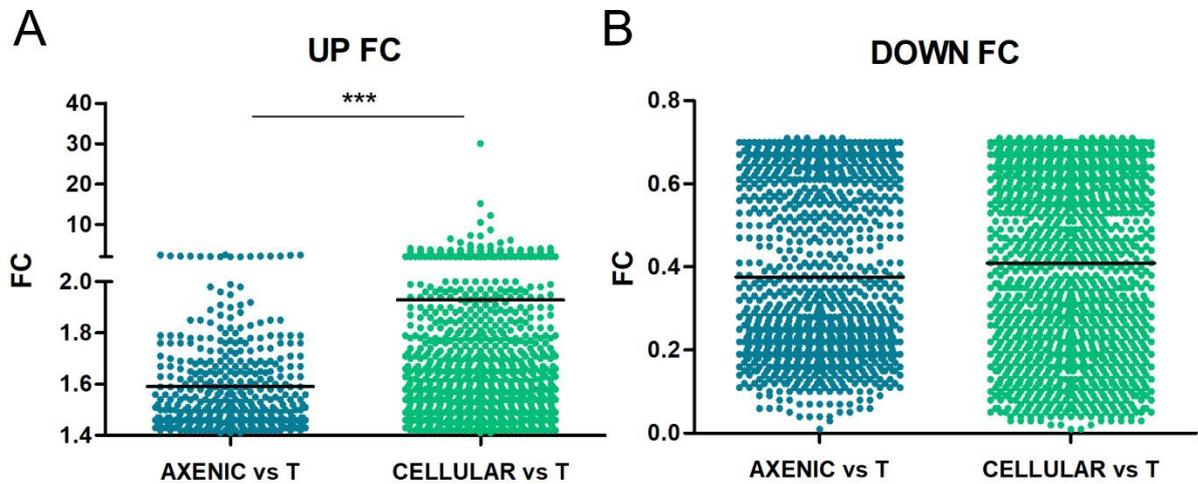


**Figura 10** - Genes diferencialmente expresados de amastigotas axénicos y amastigotas celulares cuando son comparados entre sí y con tripomastigotas celulares. Para todas las comparaciones se tuvo en consideración un  $FDR < 0,05$  y un  $FC \geq 1,5$  y  $\leq 0,67$ .

Como se mencionó antes, tanto amastigotas axénicos como celulares presentan una gran regulación negativa de genes cuando son comparados con los tripomastigotas. A su vez, alrededor de 1700 genes están diferencialmente expresados entre amastigotas celulares y axénicos.

Además, se analizó la magnitud del cambio en la expresión en las diferentes comparaciones. Los resultados se muestran en la **Figura 11**.

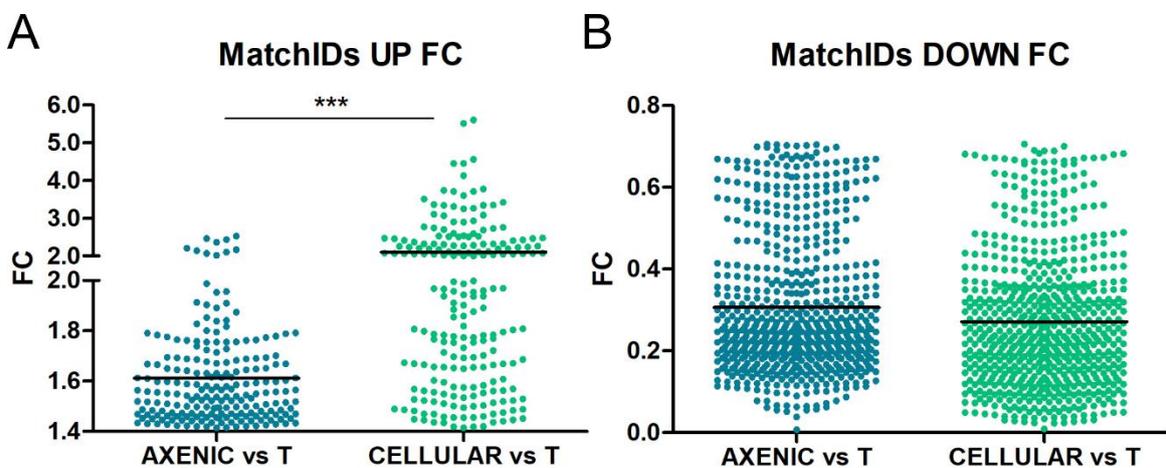
Si bien el promedio del cambio es similar para axénicos y celulares (FC entre 1.5 y 2), se observa que estos últimos presentan varios genes con grandes tasas de cambio que influyen en que la distribución se mueva hacia valores de FC mayores (**Figura 11A**).



**Figura 11** – Valores de expresión representados en BoxPlots. Se graficaron los genes diferencialmente expresados para las comparaciones Amastigota Celular vs. Tripomastigota y Amastigota Axénico vs Tripomastigota con un FDR < 0,05. **A.** Genes sobreexpresados ( $\log_2FC \geq 0,58$ ). **B.** Genes subexpresados ( $\log_2FC \leq 0,58$ ). Se utilizó el test *Mann-Whitney* para analizar la significancia entre las comparaciones.

Para aquellos genes que disminuyen diferencialmente hay una tendencia similar. Sin embargo, la diferencia es más sutil y no es estadísticamente significativa (**Figura 11B**).

Al manejar distintos números de genes en las comparaciones, decidimos hacer la misma comparación, pero tomando los genes de las intersecciones. Para eso cruzamos las listas de los genes que estaban regulados negativamente tanto para Axénico vs Tripomastigotas como para Celular vs Tripomastigota (**Figura 12**).



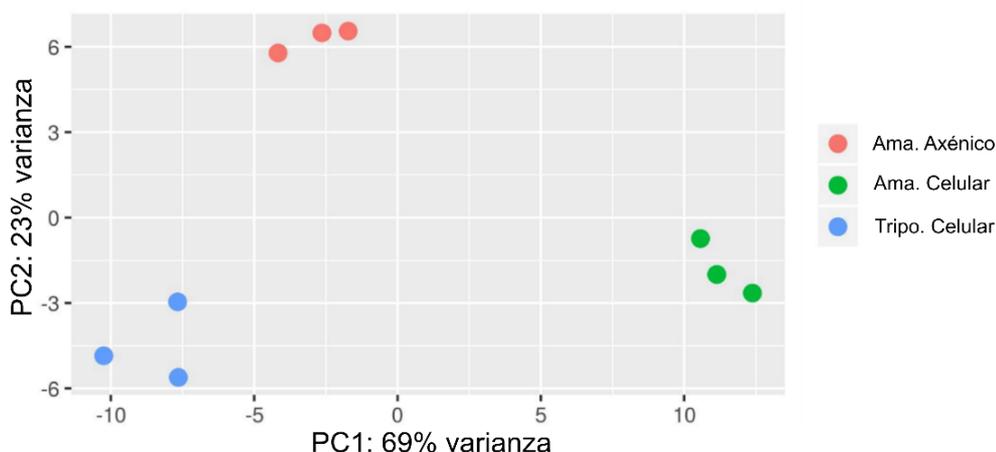
**Figura 12** - Valores de expresión representados en BoxPlots. Se graficaron los genes diferencialmente expresados para la intersección de las comparaciones Amastigota Celular vs. Tripomastigota y

Amastigota Axénico vs Tripomastigota con un FDR < 0,05. **A.** Genes sobreexpresados ( $\log_2FC \geq 0,58$ ). **B.** Genes subexpresados ( $\log_2FC \leq -0,58$ ). Se utilizó el test *Mann-Whitney* para analizar la significancia entre las comparaciones.

Cuando se compara la distribución de la expresión de genes que están regulados positivamente compartidos en ambas muestras, se identifica un patrón similar, donde la media de FC para los celulares es mayor. Por el contrario, para los genes regulados negativamente se observa una tendencia no significativa de disminución de los FC en los celulares.

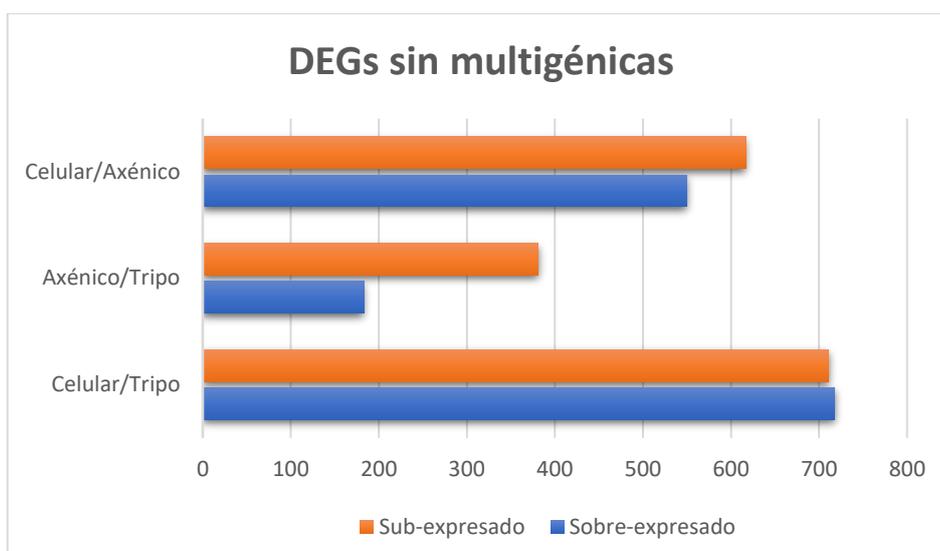
Por lo tanto, podemos concluir que además de observarse un mayor número de genes diferencialmente expresados en amastigotas celulares, para el caso de los genes regulados positivamente su nivel de cambio es de mayor magnitud.

Dado que los genes pertenecientes a familias multigénicas suponen un desafío para los algoritmos de mapeo y por lo tanto para su cuantificación precisa, que pueden llevar a sesgos en la normalización de los datos, se realizaron análisis de expresión diferencial eliminando estos genes del análisis (transialidasas, mucinas, metaloproteasas y proteínas MASP).



**Figura 13** – Análisis de los componentes principales luego de un estudio diferencial sin tener en cuenta los conteos de genes para las familias multigénicas.

En el PCA resultante, las muestras siguen estando alejadas, incluso el agrupamiento de réplicas de los axénicos se observa aún más cerca del de los tripomastigotas (**Figura 13**). Con respecto a los DEGs, no se observó un aumento significativo en el número de genes diferenciales y representaron mayormente los mismos IDs. Por lo tanto, el filtrado de los genes correspondientes a proteínas de superficie no mejora la sensibilidad del ensayo (**Figura 14**).



**Figura 14** - Genes diferencialmente expresados de amastigotas axénicos y amastigotas celulares cuando son comparados entre si y con tripomastigotas celulares. Para todas las comparaciones se tuvo en consideración un FDR < 0,05 y un FC  $\geq$  a 1,5 y  $\leq$  a 0,67. Este análisis diferencial se realizó sin tener en cuenta los conteos de genes para las familias multigénicas.

Teniendo en cuenta este último resultado, los próximos análisis serán realizados en base a los DEGs obtenidos del análisis diferencial con todos los genes, incluyendo a las familias de genes multigénicas.

#### 7.4 Procesos biológicos diferenciales entre amastigotas celulares y axénicos

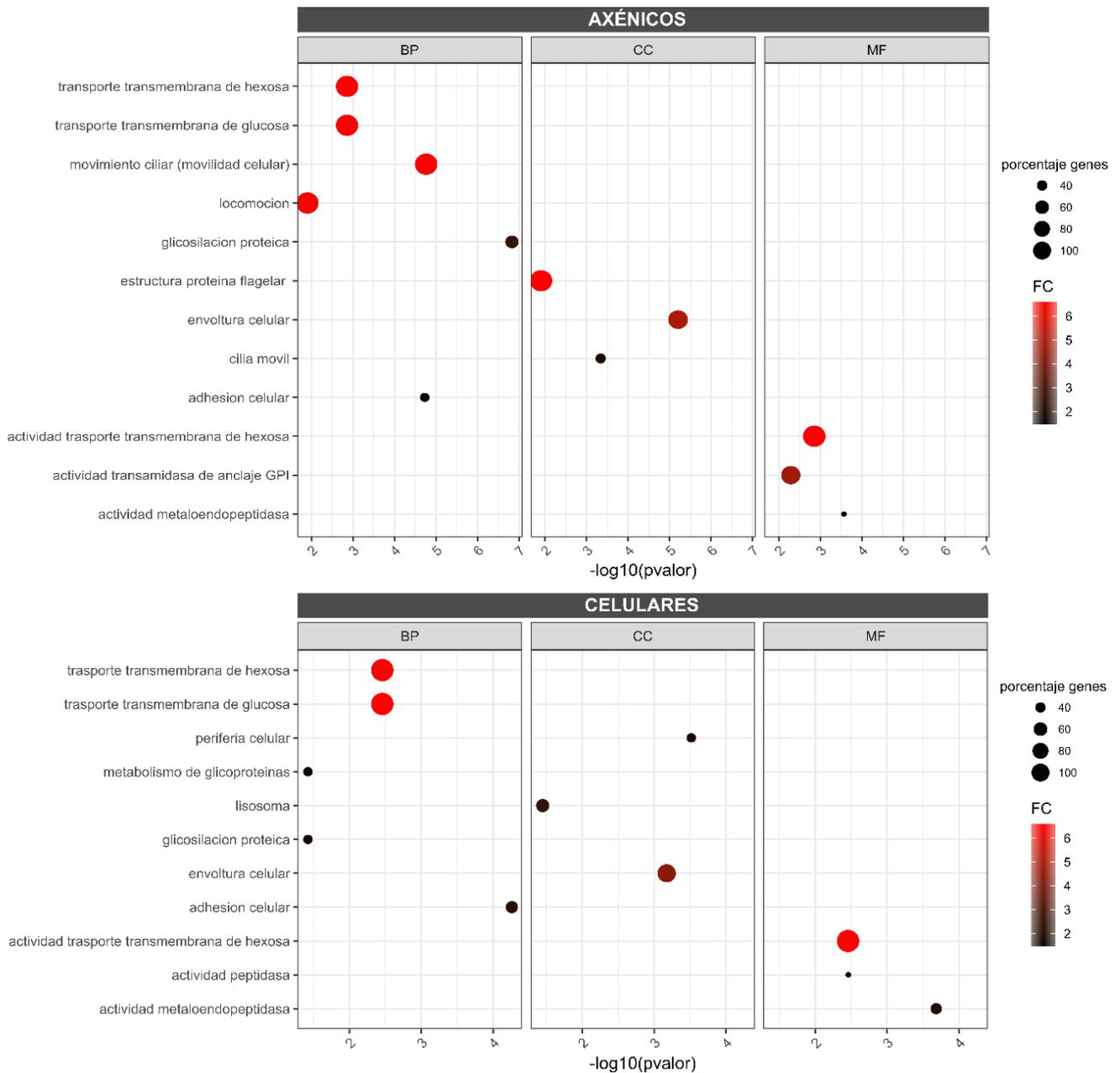
La ontología génica (GO) representa términos de funciones relacionadas entre sí de manera ordenada, las cuales tienen como objetivo describir las características biológicas de las proteínas que son codificadas por los distintos genes. La ontología de genes consta de tres categorías independientes: componentes celulares, funciones moleculares y procesos biológicos en el cual dichos genes se encuentran involucrados.

Cuando las listas de genes diferenciales obtenidos en la sección anterior son analizadas buscando términos sobrerrepresentados de ontología génica, se observa que dichos estudios correlacionan muy bien con los procesos celulares esperados para el estadio amastigota y procesos vinculados a la amastigogénesis.

En cuanto al análisis de los genes subexpresados en amastigotas tanto axénicos como celulares, los términos GO sobrerrepresentados se correlacionan con el proceso de

amastigogénesis (**Figura 15; Anexo - Tabla 2 y 3**). Entre otras, se identifican funciones moleculares como actividad metalo y endopeptidasa, y procesos biológicos como glicosilación proteica y adhesión celular. El análisis de los genes que generan el resultado de sobrerepresentación de estas categorías muestra que los mismos consisten fundamentalmente en las **glicoproteínas de superficie** propias del estadio tripomastigota, ya que las mismas alcanzan un 75% de los genes subexpresados en ambos amastigotas. Tanto el modelo axénico como el celular presentan esta regulación negativa masiva de un gran número de genes de familias multigénicas de superficie como es esperable para esta transición (**Anexo - Figura 4**). Este resultado explica lo observado en la sección anterior donde el PCA obtenido cuando las proteínas de superficie no son consideradas (**Figura 13**) muestra una mayor distancia entre los amastigotas.

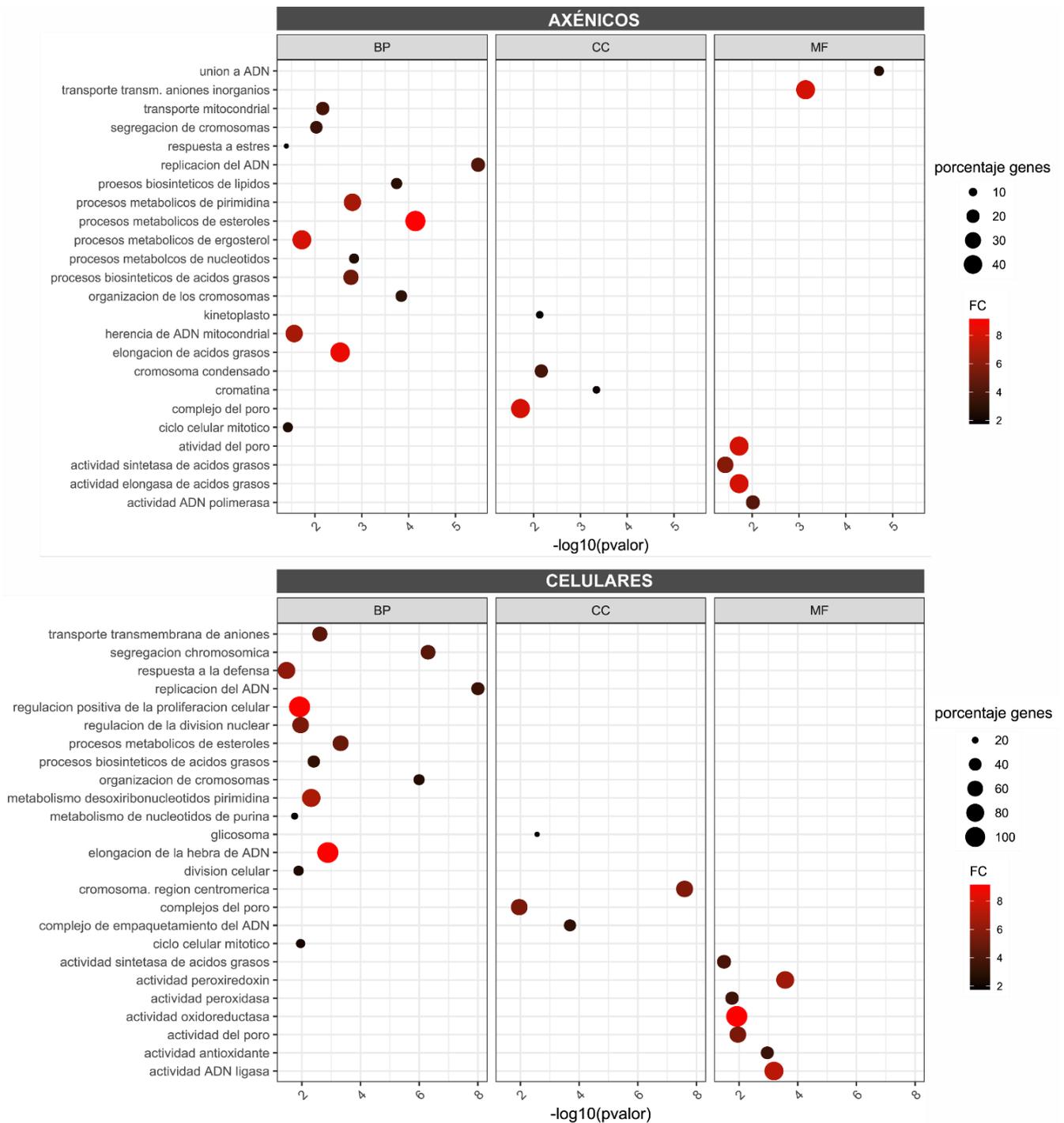
**Transporte de azúcares** como la glucosa, es otro de los procesos que se ven subrepresentados en nuestros ensayos en ambos amastigotas (**Figura 15; Anexo - Tablas 2 y 3**), resultado consistente con estudios previos (Silber et al., 2009). A pesar de que se ha comprobado que estos parásitos pueden utilizar las reservas de hexosa del hospedero, la hexosa como fuente de carbono potencial para estos parásitos se ha descartado. Esto se debe a que la glucosa se considera un componente insignificante en las células de mamíferos y no se han identificado transportadores de glucosa sobreexpresados en los amastigotas. En ambos modelos se identifican transportadores de hexosa regulados negativamente (TcCLB.511041.40, TcCLB.508551.39, TcCLB.508551.30).



**Figura 15** - Términos de Ontología Génica (GO) para genes **subexpresados** en amastigotas axénicos (panel superior) y celulares (panel inferior) cuando son comparados con tripomastigotas. Se detallan aquellos procesos sobrerrepresentados de acuerdo con las tres clasificaciones de GO (BP: procesos biológicos, CC: componentes celulares, MF: funciones moleculares). El análisis se realizó utilizando TriTrypDB y la visualización en R.

Asimismo, **proteínas flagelares** se identifican entre los genes regulados negativamente en ambos modelos. Curiosamente para los genes flagelares, se observan diferentes perfiles entre estos amastigotas. Mientras que para los axénicos todos los genes paraflagelares y de membrana flagelar (Ej. TcCLB.507711.20, TcCLB.509067.60, TcCLB.511215.119) se encuentran regulados negativamente, en los celulares estos grupos de genes parecen tener un perfil dual.

La mayoría de los transcritos flagelares se observan subexpresados (Ej. TcCLB.504153.260, TcCLB.506221.70), sin embargo, algunos de ellos se encuentran regulados positivamente (Ej. TcCLB.510323.20, TcCLB.509805.100). Este mismo fenómeno se observa al estudiar los GOs (Figura 15). Mientras que términos como movimiento ciliar, estructura proteica flagelar y cilia móvil se encuentran sobrerrepresentados en procesos subregulados para los axénicos, esto no se observa en celulares.



**Figura 16** - Términos de Ontología Génica (GO) para genes **sobreexpresados** en amastigotas axénicas (panel superior) y celulares (panel inferior) cuando son comparados con tripomastigotas. Se detallan aquellos procesos sobrerrepresentados de acuerdo con las tres clasificaciones clásicas de GO (BP: procesos biológicos, CC: componentes celulares, MF: funciones moleculares). La búsqueda de términos GOs se realizó utilizando TriTrypDB.

Al tratarse de una población intracelular heterogénea, luego de 72hs PI posiblemente algunas formas sean amastigotas replicativos, mientras que algunas otras, se encuentren transicionando hacia el estadio tripomastigota. La regulación contraria de genes flagelares en amastigotas celulares podría indicar, que la expresión de los genes responsables de la aparición del flagelo es una de las primeras señales de diferenciación hacia tripomastigota, y ocurre en etapas tempranas. Dado que el estadio amastigota es traduccionalmente más activo que los tripomastigotas, la observación inicial podría indicar que los genes comienzan a expresarse en este estadio en preparación hacia la transición a tripomastigotas.

Cuando se analizan aquellos DEGs regulados positivamente en ambos amastigotas cuando son comparados con tripomastigotas, entre otros se observan procesos enriquecidos que involucran **transporte y tráfico celular de moléculas** como distintos compuestos orgánicos e iones (**Figura 17**). Interesantemente, el gen que codifica para la proteína TcCLB.509197.39, no solo es uno de los transportadores catiónicos más expresados en ambos amastigotas, sino que representa el tercer gen más expresado para los amastigotas axénicos. Li y colaboradores, también identifican a este transportador catiónico como uno de los genes más expresados en amastigotas (Li, 2016). Visto esta coherencia en los resultados, podría ser interesante profundizar en su estudio. Junto a estos procesos de transporte anteriormente mencionados, se ven además sobrerrepresentados términos ontológicos asociados a estructuras celulares como complejos del poro y vesículas.

Se identifican procesos sobrerrepresentados esperados para el metabolismo energético del amastigota, como **procesos biosintéticos y metabólicos de ácidos grasos y de esteroides**, respectivamente (**Figura 16**).

Asimismo, para ambos amastigotas se observan sobrerrepresentados términos ontológicos vinculados al **metabolismo del ADN** y a **procesos asociados al ciclo celular**, como replicación del ADN, segregación y organización de los cromosomas y ciclo celular mitótico. Si bien estos procesos se encuentran presentes en ambos, los términos de ontología en celulares presentan una representación mayor de genes en las categorías y una significancia mayor en los resultados (**Figura 16**). Por otro lado, procesos claramente vinculados a la **división** como los GOs correspondientes a proliferación y división celular solo se ven más representados en

amastigotas celulares. Estos procesos biológicos denotan la existencia de un ciclo celular activo y de un amastigota celular replicativo. Cuando se observan en detalle cuáles son estos genes regulados positivamente, se identifican genes que codifican para factores de iniciación (Ej. TcCLB.511369.10, TcCLB.506925.120) y elongación (Ej. TcCLB.511369.10, TcCLB.510241.60) de la traducción, proteínas vinculadas a la replicación y división celular (Ej. TcCLB.506945.80, TcCLB.505945.10, TcCLB.507011.150, TcCLB.510737.110, TcCLB.506811.210). El hecho de que estos procesos claves no estén sobrerrepresentados en amastigotas axénicos, podríamos especular que posiblemente se estén activando las vías hacia la replicación, pero todavía no se ha finalizado la reprogramación de la expresión génica para completar el proceso en este modelo.

Si bien no se observa claramente y de forma estadísticamente significativa términos ontológicos asociados a los procesos replicativos a nivel nuclear en amastigotas axénicos, sí se logra identificar la activación de algunos componentes importantes asociados al metabolismo del ADN. Entre otros se ven regulados positivamente transportadores de nucleósidos (TcCLB.506203.10, TcCLB.506773.50) y genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de desoxirribonucleótidos (TcCLB.504073.30, TcCLB.506933.20, TcCLB.508989.9). También se distinguen otros genes diferencialmente expresados que podrían estar marcando el comienzo de la activación de procesos de división y proliferación. Por ejemplo, se identifica la presencia de topoisomerasa IA (TcCLB.506493.80) para relajar el ADN superenrollado previo a la replicación, de DNA polimerasa I Alpha (TcCLB.508837.180) esencial para dar inicio a la replicación y la enzima ADN ligasa (TcCLB.506289.9) para catalizar el enlace fosfodiéster entre el grupo 3'-hidroxilo extremo de una de las cadenas de ADN y el grupo 5'-difosfato del extremo de la otra cadena de ADN. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) aparece con un nivel de sobreexpresión de 1,45 veces (lo cual no supera nuestro umbral establecido de sobreexpresión), a diferencia del nivel en celulares que es de 2,01 veces, en comparación con tripomastigotas. Estas observaciones refuerzan la hipótesis de que la división celular todavía no se encuentra totalmente activa en nuestro modelo de axénicos. Además, se distinguen enzimas de reparación del ADN (Ej. TcCLB.511133.4, TcCLB.508647.290, TcCLB.510311.130), de activación y metabolismo de la transcripción (TcCLB.511589.120, TcCLB.509951.49) y algunas vinculadas a la traducción y al correcto ensamblado de proteínas (Ej. TcCLB.510347.50, TcCLB.509157.279, TcCLB.504147.60).

Interesantemente, en ambos modelos amastigotas se identifican además la presencia de genes importantes involucrados en la **regulación de la división celular** como el Complejo cromosómico pasajero (TcCLB.506221.110) y la quinasa Aurora B (TcCLB.503799.4). Ambos

representan actores esenciales para una segregación cromosómica adecuada y una correcta citoquinesis. Encontrar estos genes *sore-expresados* en axénicos nos da un indicio de que probablemente la activación a la replicación se esté iniciando y la división celular tal vez esté por comenzar. Sumado a estos resultados que revelan una posible activación temprana de la replicación en amastigotas axénicos, se ve la sobreexpresión de una desaminasa de guanina (TcCLB.504431.100) involucrada en la vía de salvataje de purinas. La mayoría de los genes que codifican para estas enzimas fueron encontrados bajo una regulación positiva en transcriptomas de amastigotas intracelulares cuando son comparados con tripomastigotas (Li, 2016).

Los amastigotas axénicos presentan activación de **funciones relacionadas al metabolismo del ADN mitocondrial** como transporte y herencia del ADN mitocondrial, sugiriendo que la replicación de este organelo estaría comenzando. Esta característica puede ser otro indicio de que este modelo axénico se encontraría en las primeras etapas de la diferenciación hacia el amastigota celular, ya que en kinetoplastidos la división del ADN mitocondrial ocurre previo a la división nuclear (Wheeler et al., 2019). Entre estos genes mitocondriales se identifican genes vinculados a la síntesis de oligonucleótidos para la síntesis de ADN mitocondrial, como *mitochondrial DNA primase* (TcCLB.503831.40) y *mitochondrial DNA polymerase I* (TcCLB.509589.10). Se encuentran además sobreexpresados otros genes que codifican para proteínas asociadas al metabolismo mitocondrial como por ejemplo la chaperona mitocondrial HSP60 (TcCLB.509157.279), la topoisomerasa mitocondrial de tipo II (TcCLB.508277.370) esencial para la segregación del minicírculo del kinetoplasto, entre otras proteínas de asociación al ADN mitocondrial (TcCLB.504625.70, TcCLB.507639.30, TcCLB.510593.49, TcCLB.506925.490). También se observa la presencia del factor de elongación G mitocondrial (TcCLB.509199.10) para la translocación ribosomal durante la elongación.

Por otro lado, tanto en amastigotas celulares como en axénicos se observan cambios en la expresión de componentes centrales de la **vía de señalización dependiente de AMPc**, indicando la activación de procesos de diferenciación en *T. cruzi* (Li et al., 2016). Entre ellos se identifican quinasas, fosfodiesterasas y desaminasas dependientes de AMPc (Ej. TcCLB.506227.150, TcCLB.508277.100, TcCLB.508277.100, TcCLB.410589.10, TcCLB.509805.10) y proteínas asociadas a la enzima adenilato ciclasa (Ej. TcCLB.428999.20). Además, se ha demostrado que los niveles intracelulares de AMPc regulan la resistencia de *T. cruzi* al estrés oxidativo. El grupo de Alonso observaron que diferentes análogos de AMPc mejoraron la proliferación de epimastigotas después de sufrir estrés oxidativo con concentraciones subletales de peróxido de hidrógeno (Sternlieb et al., 2020).

Interesantemente, dentro de las funciones de los genes sobreexpresados en amastigotas encontramos las relacionadas con el **metabolismo de las hexosas**. Aunque se han encontrado diferencias en el desarrollo del metabolismo energético para *T. cruzi*, aún se sabe poco sobre cómo los amastigotas extraen nutrientes de las células hospederas y cómo se equilibra el metabolismo en esta etapa del ciclo de vida del parásito. Las principales fuentes de carbono que alimentan la producción de energía en los amastigotas intracelulares de *T. cruzi* no se conocen definitivamente. Como se ha mencionado anteriormente, se asume que como la glucosa es un limitante en el citosol de la célula hospedera, los amastigotas intracelulares dependen de la absorción y metabolismo de aminoácidos y ácidos grasos para obtener energía (Li et al., 2016; Silber et al., 2005). En reportes previos de Li y colaboradores observan que las enzimas glicolíticas presentan una respuesta dual. Mientras que en amastigotas tempranas (4-12 hpi) los transcriptos para estas enzimas se reprimen rápidamente, en amastigotas tardías aumentan rápidamente su expresión llegando a valores de log<sub>2</sub>FC 1,5. Los autores sugieren que en las etapas replicativas probablemente se conserve cierta capacidad de glucólisis dentro de la célula hospedera (Li et al.). En nuestro trabajo observamos que la expresión de **enzimas glicolíticas** para ambos amastigotas coincide con los mismos ordenes de magnitud en las expresiones para amastigotas tardías y replicativos del trabajo de Li (Li et al., 2016) como la 3-fosfoglicerato quinasa y la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, pero otras como la hexoquinasa presentan un perfil más parecido a los amastigotas tempranos ~4hpi. Estos resultados, junto con la regulación negativa de transportadores de carbohidratos, apoyan la bibliografía reportada para los amastigotas intracelulares, en que no absorben azúcares de hexosa de la célula hospedera (Silber et al., 2009).

Un fenómeno similar al anterior ocurre con las enzimas involucradas en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, donde se observa un pico máximo de expresión a las 24-48 hpi para amas replicativos. Esto también sugiere que la capacidad respiratoria difiere para estas dos etapas de la vida del parásito, y que la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial puede ser esencial para la proliferación de *T. cruzi* amastigota en células de mamíferos (Li et al., 2016). Nuestros datos muestran que la mayoría de los genes que codifican para **enzimas involucradas en la cadena respiratoria** no se ven sobreexpresados en amastigotas axénicos cuando se los compara con los tripomastigotas, a diferencia del citocromo b5 que si está regulada positivamente y además representa el segundo gen más regulado para los amastigotas axénicos. Estos resultados junto con las apreciaciones anteriores sugieren nuevamente que este modelo axénico podría no ser replicativo y representar un amastigota temprano. Sin embargo, para el amastigota celular si se logra observar una regulación positiva para algunas otras de las

enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Además del citocromo b5 (TcCLB.506773.44), aparecen aumentadas varias citocromo c oxidasas (Ej. TcCLB.506649.50, TcCLB.510565.30), succinato deshidrogenasas (Ej TcCLB.504035.84, TcCLB.505843.24) y la ATPase subunidad 9 (TcCLB.503579.70).

En amastigotas celulares se encuentran sobrerrepresentadas varias vías implicadas en el **metabolismo lipídico**. Entre ellas se distinguen elongación de ácidos grasos, biosíntesis de ergosterol y metabolismo de alfa-ácido linoleico (**Tabla 2**). En cuanto a la **oxidación de ácidos grasos** (AG), se logra identificar solo en amastigotas intracelulares, algunas de las enzimas involucradas como *3-ketoacyl-CoA thiolase* (TcCLB.510507.20), *enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor* (TcCLB.508185.10) y *enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein* (TcCLB.511529.160). Ninguna de estas aparece regulada positivamente en amastigotas axénicos.

Amastigotas Celulares				
ID	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor
ec00360	metabolismo de fenilalanina	12	21,8	3,79E-02
ec00240	metabolismo de pirimidina	15	23,4	1,10E-02
ec00592	metabolismo de alpha-ácido linoleico	9	24,3	3,66E-02
ec00260	metabolismo de glicina, serina y treonina	11	25,0	1,77E-02
ec00220	biosíntesis de arginina	7	28,0	3,09E-02
ec00310	degradación de lisina	19	27,1	6,45E-04
ec00650	metabolismo de butanoato	12	34,3	7,23E-04
ec00280	degradación de valina, leucina e isoleucina	12	37,5	2,77E-04
ec00480	metabolismo de glutatión	18	37,5	7,40E-06
ec00062	elongación de ácidos grasos	9	47,4	2,10E-04
PWY-7211	biosíntesis se novo de desoxirribonucleótidos de pirimidina	7	36,8	4,53E-05
PRPP-PWY	biosíntesis de histidina, purinas y pirimidinas	6	18,8	7,89E-03
SYN-PWY	biosíntesis de ergosterol	5	33,3	1,03E-03
PWY66-5	biosíntesis de colesterol	5	35,7	7,17E-04
PWY-7229	biosíntesis de novo de nucleótidos de adenosina	4	28,6	6,33E-03
PWY-7226	biosíntesis se novo de desoxirribonucleótidos de guanosina	3	60,0	1,64E-03
PWY-6609	salvataje de adenina y adenosina	3	50,0	3,02E-02
PWY-4081	reacciones redox glutatión-peróxido	7	58,3	2,75E-02
DETOX1-PWY-1	degradación de especies reactivas al oxígeno	6	40,0	7,23E-03

**Tabla 2** - Vías metabólicas sobrerrepresentadas en amastigotas celulares cuando son comparados con tripomastigotas celulares. Las mismas fueron identificadas usando la base de datos KEGG y MetaCyc en TriTrypDB, teniendo en cuenta p-valores menores a 0,05.

Si bien para axénicos no se observan enzimas específicas para la oxidación de AG, si se observan varios transcritos sobreexpresados involucrados en el metabolismo de lípidos. Como por ejemplo asociados a funciones de biosíntesis (TcCLB.510599.14 *acetyl-CoA carboxylase*, TcCLB.506661.20 *fatty acid elongase*) y transporte (Ej TcCLB.507467.40 *choline/carnitine O-acetyltransferase*) de ácidos grasos. A su vez, también se logran identificar vías KEGG y MetaCyc sobrerrepresentadas de algunos procesos vinculados al metabolismo de lípidos como biosíntesis de esteroides, metabolismo de ácido linoleico, biosíntesis de AG de cadena larga y biosíntesis de ergosterol (**Tabla 3**).

En cuanto a las **vías metabólicas de aminoácidos**, en amastigotas celulares se observa un aumento en la sobrerrepresentación de estas vías KEGG en comparación con los amastigotas axénicos. Se identifican vías de degradación de distintos AA como valina, leucina, isoleucina y lisina; y metabolismo otros AA como glicina, serina, treonina y fenilalanina (**Tabla 2**). A pesar de no encontrarse términos de ontología enriquecidos ni vías metabólicas sobrerrepresentadas, en ambos modelos de amastigotas se detectan varias permeasas de aminoácidos siendo *amino acid permease/transporter* (TcCLB.506773.90) la proteína más diferencialmente expresada en axénicos, con un *fold change* de 2,5. Del mismo modo, para ambos amastigotas la enzima glutamato deshidrogenasa (GlutDH) se observa aumentada cuando son comparados con los tripomastigotas. GlutDH desempeña un papel fundamental al convertir el glutamato en alfa-cetoglutarato, que luego se integra en el ciclo del ácido cítrico (TCA) para reabastecer los compuestos que se desvían hacia procesos de creación de moléculas.

Amastigotas Axénicos				
ID	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor
ec00240	metabolismo de pirimidinas	13	20,3	1,07E-04
ec00100	biosíntesis de esteroides	4	22,2	2,39E-02
ec00591	metabolismo de ácido linoleico	4	20,0	3,44E-02
ec00520	metabolismo de azúcar-aminos y azúcar-nucleótidos	13	11,2	2,81E-02
ec00983	metabolismo de drogas y otras enzimas	13	14,8	2,74E-03
PWY-7211	biosíntesis <i>de novo</i> de desoxirribonucleótidos de pirimidina	12	16,2	2,34E-03
PWY-7601	biosíntesis de ácido araquidónico	8	28,6	2,68E-04
PWY66-409	salvataje de nucleótidos de purinas	7	23,3	2,44E-03
SYN-PWY	biosíntesis de ergosterol	6	26,1	2,74E-03
PRPP-PWY	biosíntesis de histidina, purinas y pirimidinas	6	17,6	2,02E-02
PWY-7229	biosíntesis <i>de novo</i> de nucleótidos de adenosina	5	31,3	2,66E-03
PWY66-5	biosíntesis de colesterol	5	23,8	9,50E-03
PWY-7036	biosíntesis de AG de cadena larga	3	42,9	7,82E-03
PWY-7226	biosíntesis <i>de novo</i> de desoxirribonucleótidos de guanosina	3	37,5	1,19E-02

**Tabla 3** - Vías metabólicas sobrerrepresentadas en amastigotas axénicos cuando son comparados con tripomastigotas celulares. Las mismas fueron identificadas usando la base de datos KEGG y MetaCyc en TriTrypDB, teniendo en cuenta p-val.

En amastigotas celulares se logran identificar un mayor número de vías KEGG sobrerrepresentadas vinculadas no solo al metabolismo de lípidos sino también al de aminoácidos. Entre ellas se distinguen vías de degradación y biosíntesis de distintos AA (Ej. valina, lisina, leucina, isoleucina, arginina) y metabolismo de distintos lípidos como alpha-ácido linoleico, butanoato y otros ácidos grasos (**Tabla 2**).

## 7.5 Relación hospedero-patógeno. Genes de infección y permanencia.

Una vez identificado aquellos genes diferenciales para los modelos de amastigotas y habiendo establecido sus perfiles de expresión, para cumplir con los últimos dos objetivos planteados se analizaron genes específicos de interés, como aquellos implicados en la permanencia de la infección u otros involucrados en la relación directa con el hospedero.

En cuanto a la interacción parásito-hospedero, los amastigotas siendo intracelulares obligados, deben aprovechar los recursos nutricionales de sus células hospedadoras para sobrevivir. Como se dijo anteriormente, la glucosa es limitante en el citosol de la célula hospedera, y los amastigotas intracelulares dependen principalmente de la captación o biosíntesis de aminoácidos y ácidos grasos para obtener energía. Nuestros datos revelan un aumento del metabolismo lipídico tanto en amastigotas axénicos como en amastigotas celulares cuando son comparados con tripomastigotas, no solo procesos biológicos y funciones moleculares asociadas sino también vías metabólicas sobrerrepresentadas (**Figura 15 y 16; Tabla 2 y 3**).

Se ha reportado que otros de los recursos que los amastigotas intracelulares suelen acoplar al hospedero, es la captación de pirimidinas en función de la disponibilidad de la coenzima Q10 que el hospedero tenga para su biosíntesis (Caradonna et al., 2013). Una de las vías KEGG sobrerrepresentadas en ambos amastigotas es la vía de **metabolismo de pirimidinas** (ec00240) (**Tabla 2**).

Asimismo, también en ambos amastigotas se ven sobrerrepresentadas **vías de salvataje** para estos compuestos, como salvataje de nucleótidos de purinas en amastigotas axénicos y salvataje de adenina y adenosina en amastigotas celulares (**Tabla 2 y Tabla 3**). Esta facilidad que tiene el parásito de absorber estos compuestos y recuperarlos del medio, le permite estimular la replicación y su crecimiento dentro de la célula, y de esta manera contribuir al mantenimiento de la infección. Como ha sido reportado anteriormente, a diferencia de los mamíferos, los parásitos protozoarios no poseen las enzimas necesarias para la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina y dependen por completo de las vías de la captación de los nucleótidos de purina necesarios en el metabolismo celular. Hemos identificado la sobreexpresión en amastigotas celulares de 3 de las 5 enzimas más importantes en la vía de salvataje de purinas en *T. cruzi* (TcCLB.506457.40: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, TcCLB.509965.370: adenosine kinase, TcCLB.508387.20: methylthioadenosine phosphorylas). En cuanto a los

amastigotas axénicos, 2 de las 5 enzimas más relevantes en este proceso (adenosine kinase y nucleoside phosphorylase) se observaron reguladas positivamente también en este modelo.

Con respecto a la **sobrevida del parásito** dentro de la célula hospedera y a la respuesta inmune del hospedero en respuesta a la infección, identificamos genes diferenciales relevantes. La sobreexpresión del gen que codifica para la proteína tryparedoxina peroxidasa confiere resistencia a las defensas oxidativas de las células hospederas, favoreciendo así la supervivencia del parásito. Esta enzima pertenece a la familia de las peroxirredoxinas (Prxs), una familia muy extendida de proteínas altamente conservadas presentes en todos los reinos con función antioxidante por medio de su actividad peroxidasa. Se han identificado cinco peroxidases distintas en *T. cruzi*, que difieren en su ubicación subcelular y especificidad de sustrato (Wilkinson, 2003; Piñeyro et al., 2011). Piacenza y colaboradores utilizaron parásitos sobreexpresantes de estas enzimas, y demostraron que las peroxirredoxinas desintoxican eficientemente el peroxinitrito en las células y protegen a los parásitos de las acciones nocivas de este oxidante (Piacenza et al., 2008). En nuestro set de datos esta proteína (TcCLB.505983.9) se encuentra 3,7 veces más expresada en amastigotas celulares en comparación con los tripomastigotas, mientras que no se observa regulación positiva en los axénicos.

Otros estudios demostraron que las peroxirredoxinas son importantes en la supervivencia, replicación y diferenciación de *T. cruzi* y podrían constituir factores de virulencia (Piacenza et al., 2013). Estas enzimas juegan un papel esencial como antioxidantes por sus actividades peroxidasa y peroxinitrito reductasa. La peroxirredoxina (TcCLB.509499.14) es otra de las proteínas que se ven sobreexpresadas en amastigotas celulares y no en axénicos.

Otro resultado que acompaña este análisis es que el metabolismo del glutatión, asociado a la respuesta redox frente al estrés oxidativo, aparece como vía sobrerrepresentada solo en amastigotas celulares. (**Tabla 2**)

Interesantemente, se observa al gen que codifica para la proteína superóxido dismutasa de hierro (TcCLB.507039.10) aumentada con el mismo nivel de magnitud no solo en amastigotas celulares sino también en axénicos. Las SODs constituyen un componente clave en la defensa antioxidante del parásito, removiendo el exceso de aniones superóxidos dentro de la célula convirtiéndolo en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Estas están clasificadas según su grupo prostético (cobre y zinc, hierro o manganeso, o níquel) y localizadas en distintos organelos celulares (citosol, glicosoma y mitocondria). En particular, las SODs de hierro (FeSOD) son las usualmente encontradas en procariotas, protozoarios, plantas y algas. Como FeSOD está ausente en el huésped humano, esta enzima podría considerarse un objetivo potencial para la

quimioterapia contra los tripanosomatidos (Hickson et al., 2022). Las SODs representan una de las primeras y esenciales barreras de defensa en estos organismos contra el daño celular causado por las ROS. Se ha evidenciado que aquellos organismos que carecen de esta enzima son más vulnerables al daño oxidativo, lo que se traduce en fenómenos como un crecimiento reducido, una vida media disminuida, mutagénesis y una mayor sensibilidad a posibles cambios en las condiciones de cultivo o a los subproductos generados durante su propio ciclo reductor (Fridovich, 1998). Del mismo modo se ha visto que amastigotas sobreexpresantes de FeSOD mitocondrial son más resistentes a la apoptosis, demostrando así la importancia de esta enzima como parte de un mecanismo de evasión del sistema inmune basado en antioxidantes, ya sea por la desintoxicación de O<sub>2</sub> y/o la restricción de la formación de peroxinitrito (Estrada et al., 2018). Si bien es esperable que esta FeSOD se encuentre aumentada en amastigotas celulares, puede parecer extraño que aparezca también aumentada en amastigotas axénicos a los cuales no se les estimuló la respuesta oxidativa. Esto indicaría que posiblemente la expresión de esta enzima forma parte del programa de diferenciación de los amastigotas no siendo necesario un estímulo externo de la célula para provocar su expresión.

En base a estos resultados, el modelo de amastigota axénico obtenido muestra una actividad muy reducida en procesos importantes para el estadio intracelular relacionados a la respuesta a estrés y supervivencia del parásito intracelular. Queda por determinarse cuáles de estos procesos no se ven modificados en el axénico debido a que estos parásitos representan una etapa temprana de diferenciación y/o cuáles requieren de la interacción directa con el hospedero. Definir, si las diferencias observadas en el trabajo entre amastigotas axénicos y celulares indican que determinados procesos requieren de la interacción directa del parásito con la célula hospedera para activarse. Alternativamente, podemos plantearnos que las condiciones en las cuales se diferenciaron los amastigotas axénicos representan una etapa temprana de diferenciación en la que los perfiles de expresión génica no alcanzaron la etapa de activación de estas vías. No descartamos que pueda haber una combinación de estas alternativas dependiendo del proceso particular.

En futuros ensayos se pretende determinar hasta qué punto este proceso *in vitro* es mejorable, teniendo en cuenta que no es posible recrear todos los estímulos recibidos por la célula hospedera en una situación de infección intracelular real.

## 7.6 Proteínas de unión a ARN

En la búsqueda de posibles genes candidatos en la regulación de procesos infectivos, se encontraron **proteínas de unión al ARN** (RBPs) con expresión diferencial. Dado que la regulación de la expresión génica para estos tripanosomátidos es en su mayoría se da a nivel postranscripcional, las RBPs suelen tener un rol muy influyente en los distintos estadios del parásito, regulando la expresión de genes muchas veces relacionados funcionalmente.

Una de las RBPs reguladas positivamente en amastigotas axénicas cuando son comparados con tripomastigotas es la TcCLB.504005.6 *RNA-binding protein, putative*. Esta proteína está sobreexpresada en amastigotas tardíos y se ha sugerido su participación en la regulación de procesos críticos para el crecimiento del amastigota en una etapa tardía o en la conversión de amastigota a tripomastigota a partir de ~ 96-120 hpi (Li et al., 2016). Esta puede ser una de las razones por las cuales no se observa sobreexpresada en nuestros amastigotas celulares de 72hpi. Nuestros datos sugieren que probablemente esta RBP esté más involucrada en procesos infectivos y probablemente no solo represente una de las primeras proteínas en activarse en la diferenciación amastigota - tripomastigota, sino también sea una de las últimas en desactivarse en la transición tripomastigota - amastigota. Esto apoya nuestra hipótesis de que el modelo de amastigotas axénicas represente las primeras etapas de diferenciación y por lo tanto aun no presenten una disminución de la expresión de esta proteína.

Otra RBP que presenta una expresión desigual entre amastigotas es la RBP6 (TcCLB.506693.30). La misma se encuentra subexpresada en amastigotas celulares cuando son comparados con tripomastigotas. Esta disminución ha sido previamente reportada por el grupo de El-Sayed (Li et al., 2016)(Li, 2016), sugiriéndose para esta proteína funciones importantes específicas de estadios no-replicativos e infectivos del parásito. Interesantemente, cuando comparamos el nivel de expresión no solo de la RBP6 sino también de la RBP5 entre ambos amastigotas, se observa que los amastigotas axénicos las regulan positivamente en relación a los amastigotas celulares. Probablemente, al igual que la TcCLB.504005.6, estas RBPs no solo estén asociadas a procesos infectivos propios del estadio tripomastigota, sino que también formen parte del grupo de las RBPs que tienen una regulación negativa tardía en la transición tripomastigota-amastigota. Además, se identificaron otras RBPs (TcCLB.511127.10, TcCLB.505007.10, TcCLB.507885.10) que cumplen con estas características y probablemente estén involucradas en la regulación de grupos de mensajeros funcionalmente relacionados. Estos patrones de expresión de este grupo de RBPs posiblemente vinculadas a la invasión, sugieren que probablemente tengan y una regulación negativa tardía en amastigotas celulares.

La RBPs TcCLB.507711.40 y la RBP TcCLB.506625.70 presentan un patrón de expresión inverso, resultado sobreexpresadas en amastigotas celulares con respecto tripomastigotas, pero están subexpresadas cuando se compara con el transcriptoma de los axénicos. Es decir, los axénicos estarían regulando negativamente estas RBPs respecto a los amastigotas celulares. Parecería que a diferencia del otro grupo de RBPs comentado en el párrafo anterior posiblemente vinculadas a la invasión, estas no tendrían una regulación negativa tardía en amastigotas. Por esta razón, se podría especular que están asociadas a procesos vinculados al metabolismo propio de estadios replicativos.

Teniendo en cuenta la totalidad de resultados obtenidos en la tesis y comentados anteriormente, los amastigotas celulares que se obtuvieron en el trabajo presentan las características transcriptómicas descritas para este estadio, lo cual valida nuestros resultados de *Dual RNA-Seq*. A su vez, esto nos permitió realizar una evaluación precisa de las diferencias de estos amastigotas con los axénicos. Por su parte, estos últimos presentaron características similares a los amastigotas celulares en cuanto a la regulación negativa de genes flagelares y glicoproteínas de superficie, al metabolismo energético en cuanto a la utilización de lípidos y aminoácidos y en la presencia de algunos genes importantes involucrados en la regulación de la replicación y división celular; mientras que los procesos vinculados a la sobrevivencia del parásito en su interacción con el hospedero y procesos y vías sobrerrepresentadas implicadas en la replicación del ADN nuclear no fueron recapitulados por este modelo. Es interesante que algunos de los resultados obtenidos en el modelo axénico podrían ser explicados por la falta de estímulos biológicos que se dan únicamente mediante la interacción directa con la célula hospedera, mientras que otros podrían deberse a que nuestro modelo podría estar en una fase inicial del proceso de diferenciación.

Teniendo en cuenta estos resultados nos propusimos mejorar la diferenciación axénica implementando diversos protocolos de diferenciación. Para la optimización hicimos uso de los resultados anteriores que nos permitieron definir genes marcadores para vías que no fueron recapituladas en el modelo axénico.

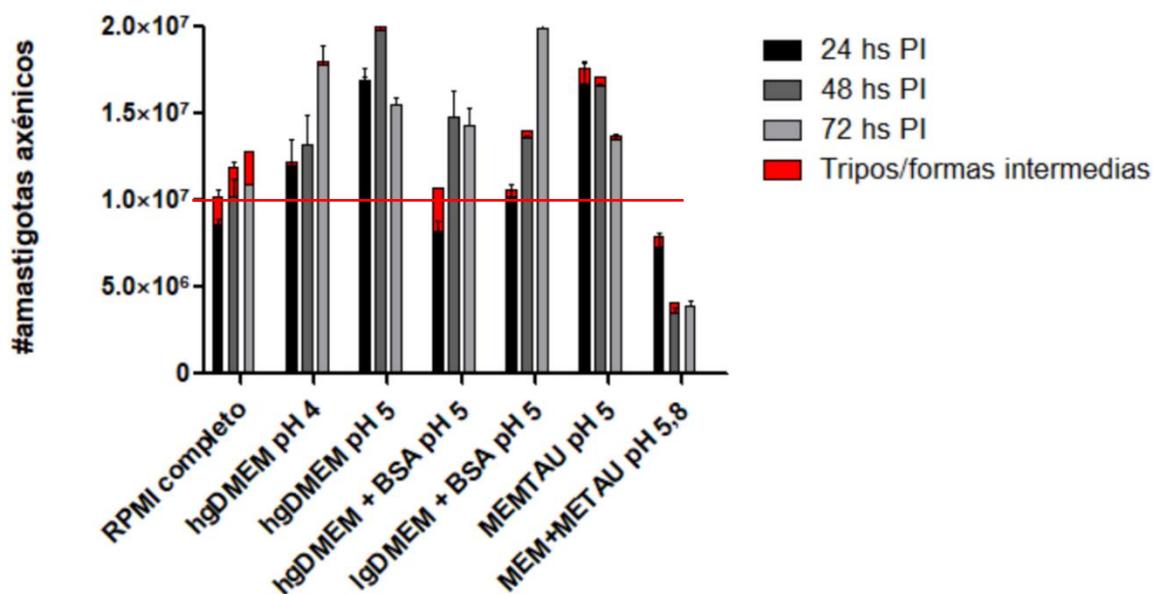
## 7.7 Evaluación de protocolos alternativos de amastigogenesis axénica

Como comentamos en la sección anterior y en base a los resultados que se obtuvieron, decidimos ampliar el estudio y probar protocolos alternativos de amastigogenesis secundaria axénica, con el fin de mejorar el modelo anteriormente propuesto.

Particularmente se ajustaron diferentes protocolos evaluando a nivel fenotípico la capacidad replicativa de los amastigotas diferenciados *in vitro* y los porcentajes de diferenciación. Una vez definidas las condiciones óptimas a este nivel, se buscó evaluar procesos metabólicos característicos de amastigotas celulares haciendo uso de marcadores moleculares definidos a partir de las listas de genes diferenciales obtenidas en los resultados anteriormente comentados.

Para evaluar la capacidad replicativa de los amastigotas axénicos, se estudió el cultivo axénico mediante el seguimiento y conteo cada 24 hs durante 3 días de incubación en los distintos medios de diferenciación (**Figura 17**). Se establecieron distintas estrategias para producir la diferenciación partiendo de  $1,0 \times 10^7$  tripomastigotas celulares incubados en los medios que se detallan a continuación:

1. RPMI completo (modelo axénico anterior)
2. hgDMEM pH 4 sin FBS
3. hgDMEM pH 5 sin FBS
4. hgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS
5. IgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS
6. MEMTAU pH 5
7. MEM frío/MEMTAU pH 5,8



**Figura 17** – Amastigogenesis axénica secundaria y evaluación de la capacidad replicativa de amastigotas en un cultivo axénico. Número de parásitos (y) y medios de incubación utilizados (x). El número de tripomastigotas y/o formas intermedias se representan en rojo junto a las barras de los amastigotas. El número inicial de tripomastigotas celulares que se utilizó está delimitado por la línea roja horizontal.

En base a estos resultados, se puede decir que para los medios 2, 3, 4 y 5 los amastigotas se están dividiendo, al verse un aumento del número de amastigotas a medida que pasan las horas. A su vez, los amastigotas axénicos de los medios 3 y 5 alcanzan el mayor número de amastigotas de todas las condiciones ( $2 \times 10^7$ ).

Por otro lado, y en función del número de amastigotas axénicos y el número de tripomastigotas y/u formas indiferenciadas presentes en el cultivo, se calculó un porcentaje de diferenciación para cada día (**Tabla 4**).

A pesar de que el medio 6 alcanza un buen porcentaje de diferenciación a las 24 hs post-incubación, se observa un decaimiento en el número de amastigotas conforme avanzan los días. Algo similar ocurre con el medio 7, si bien el porcentaje de diferenciación llega a 100% al tercer día, los conteos para amastigotas axénicos decaen abruptamente en los últimos días. Esto quiere decir que, aunque la diferenciación sea total al último día, el cultivo celular tiende a morir conforme pasan las horas.

	% Diferenciación (%)		
	24 hs PI	48 hs PI	72 hs PI
RPMI completo	81,6	83,3	82,8
hgDMEM pH 4	98,4	100,0	99,5
hgDMEM pH 5	99,4	99,0	100,0
hgDMEM + BSA pH 5	69,7	100,0	100,0
IgDMEM + BSA pH 5	96,3	98,6	100,0
MEMTAU pH 5	94,3	96,6	98,6
MEMfrio/METAU pH 5,8	92,3	84,2	100,0

**Tabla 4** - Medida de la diferenciación hacia el estadio amastigota. Se incubaron  $1 \times 10^7$  tripomastigotas celulares en cada uno de los medios y se realizó un conteo de los amastigotas axénicos diferenciados, así como los tripomastigotas y/o formas indiferenciadas a las 24, 48 y 72 hs. En función del número de parásitos diferenciados y no diferenciados se realizó el cálculo promedio de diferenciación expresado en porcentaje.

Para el medio que se utilizó en el estudio principal de este trabajo (1, RPMI completo) se observa un comportamiento constante tras el avance de las horas. Además de representar el medio con el porcentaje de diferenciación más bajo, tampoco se observa un aumento considerable en el número de amastigotas axénicos conforme pasan los días. Esto es coherente

con la ausencia de procesos sobrerrepresentados vinculados a la división celular y proliferación en el estudio de expresión diferencial realizado anteriormente.

Por otro lado, se evaluó el nivel de expresión de transcritos que codifican para marcadores moleculares del estadio intracelular por qPCR para todas las condiciones (**Tabla 5**). Se seleccionaron aquellos genes que representan procesos biológicos característicos en amastigotas celulares, y que su expresión se encuentre aumentada con respecto al estadio tripomastigota. A su vez, se buscó que estos genes seleccionados no se encuentren diferencialmente expresados en el modelo axénico propuesto, pudiendo de esta manera mejorar el método de diferenciación anterior.

Se seleccionaron genes que codifican para proteínas involucradas en procesos fundamentales en amastigotas, como replicación, división celular y proliferación, así como también aquellos vinculados a la supervivencia del parásito dentro de la célula y al metabolismo de lípidos. Se seleccionaron algunos genes representativos de cada proceso y se diseñaron *primers* específicos para dichos genes.

Replicación y división celular			
IDs	Producto	FC	Padj
TcCLB.508277.150	proliferative cell nuclear antigen (PCNA)	2,01	8,97E-19
TcCLB.510351.31	histone H4	15,15	7,73E-10
Oxidoreducción/defensa antioxidante			
IDs	Producto	FC	Padj
TcCLB.509499.14	peroxidoxin	2,28	9,49E-39
TcCLB.487507.10	tryparedoxin peroxidase	3,24	0,0015
Metabolismo de lípidos			
IDs	Producto	FC	Padj
TcCLB.511073.10	fatty acid desaturase	1,99	3,91E-17
TcCLB.510507.20	3-ketoacyl-CoA thiolase	2,21	2,00E-36
Actividad del proteasoma			
IDs	Producto	FC	Padj
TcCLB.511001.240	proteasome activator protein pa26	4,07	0,015
TcCLB.511111.50	ubiquitin-conjugating enzyme	2,34	6,31E-13
Otras			
IDs	Producto	FC	Padj
TcCLB.504153.260	Flagellum attachment zone protein 12	0,45	9,61E-36

**Tabla 5** - Genes marcadores seleccionados para controlar el proceso de diferenciación axénica en diferentes medios.

En una primera instancia, se evaluó la eficiencia de amplificación de los primers anteriormente diseñados (**Tabla 6**). El cálculo de eficiencia para cada par de cebadores se realizó a partir de la pendiente del gráfico CT vs log concentración donde la eficiencia queda definida como: Eficiencia =  $[10^{-(1/pendiente)}]-1$ . Los perfiles y el detalle de los cálculos se adjuntan en Anexo. (**Anexo Figura 2 y 3**).

Gen	Eficiencia (%)
Peroxidoxin	90
PCNA	91
Triparedoxin peroxidasa	97
Desaturasa de ácidos grasos	100
3k-CoA-Tiolasa	67
Flagelar12	97
HistonaH4	82
PA26	150
Ubiquitina	92
Gapdh	100

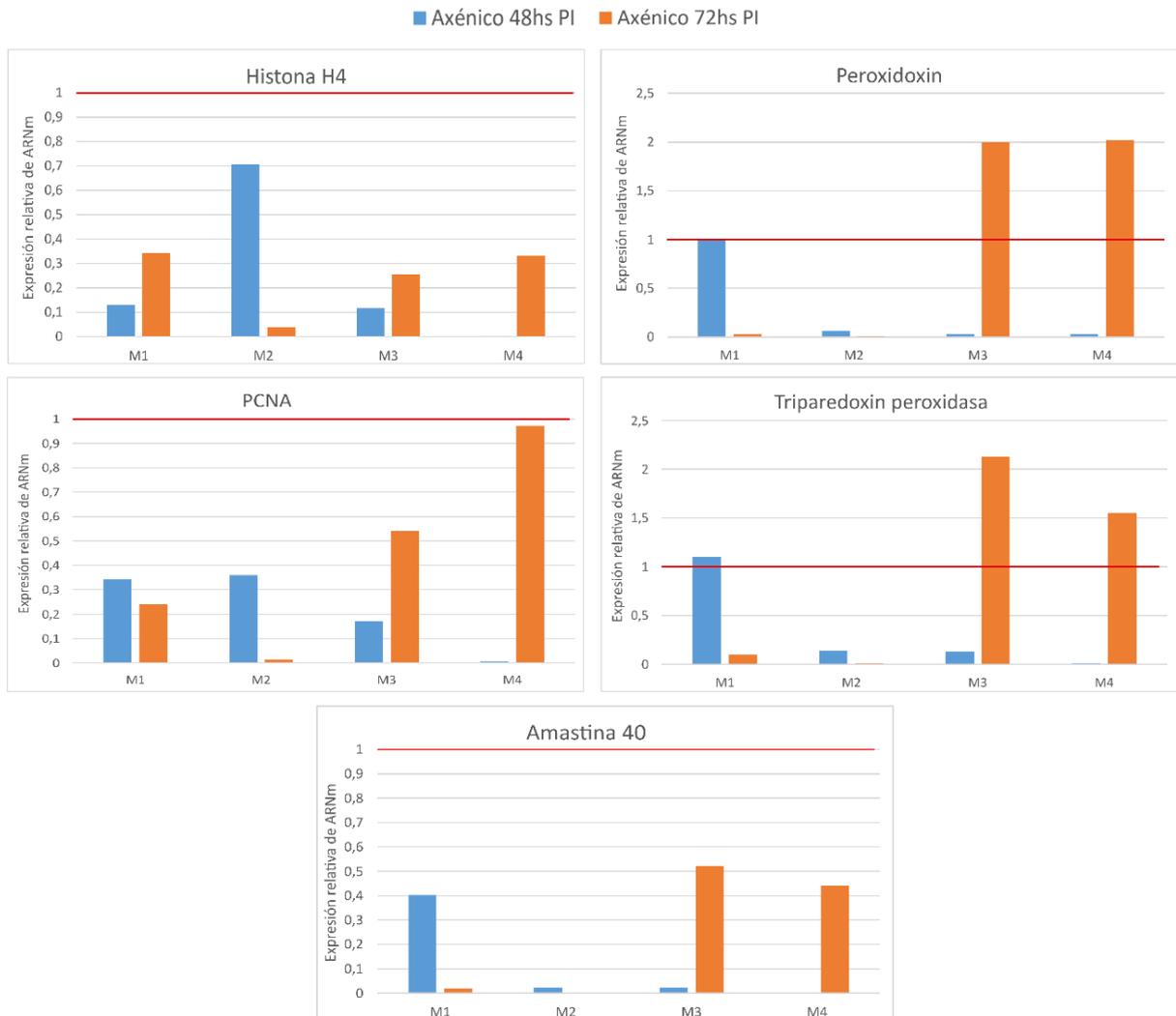
**Tabla 6** - Eficiencias de los cebadores calculadas para cada gen a partir de la pendiente del gráfico CT vs log de la concentración según: Eficiencia =  $[10^{-(1/pendiente)}]-1$ . De arriba abajo: peroxidoxin, antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), triparedoxin peoxidasa, desaturasa de ácidos grasos, cetoacil-CoA tiolasa, proteína 12 de la zona de unión al flagelo, histona H4, proteína activadora del proteasoma, enzima conjugadora de ubiquitina y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogena.

El resultado anterior muestra que los primers presentan en general buena eficiencia, exceptuando los diseñados para PA16 y 3k-CoA-Tiolasa que no fueron utilizados para posteriores análisis. Por lo tanto, se estudió el nivel de expresión de los genes seleccionados expresados en valores relativos de ARN. Para dicha cuantificación, se normalizaron los valores contra el gen control de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) ( $CT_{gen} - CT_{goi}$ ), calculado como  $2^{-(CT_{gen}-CT_{goi})}$ . A su vez, para calcular el cambio en la expresión entre ambos amastigotas, se realiza una normalización del valor en los axénicos en relación al valor correspondiente en los celulares.

Para esta evaluación, se seleccionaron los medios de diferenciación que parecerían ser los más prometedores. Se utilizaron muestras a las 48hs y 72 hs post incubación. Los medios fueron así rotulados:

- M1: hgDMEM pH 4 sin FBS
- M2: hgDMEM pH 5 sin FBS
- M3: hgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS
- M4: IgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS

Los resultados se muestran en las Figuras 18 y 19.

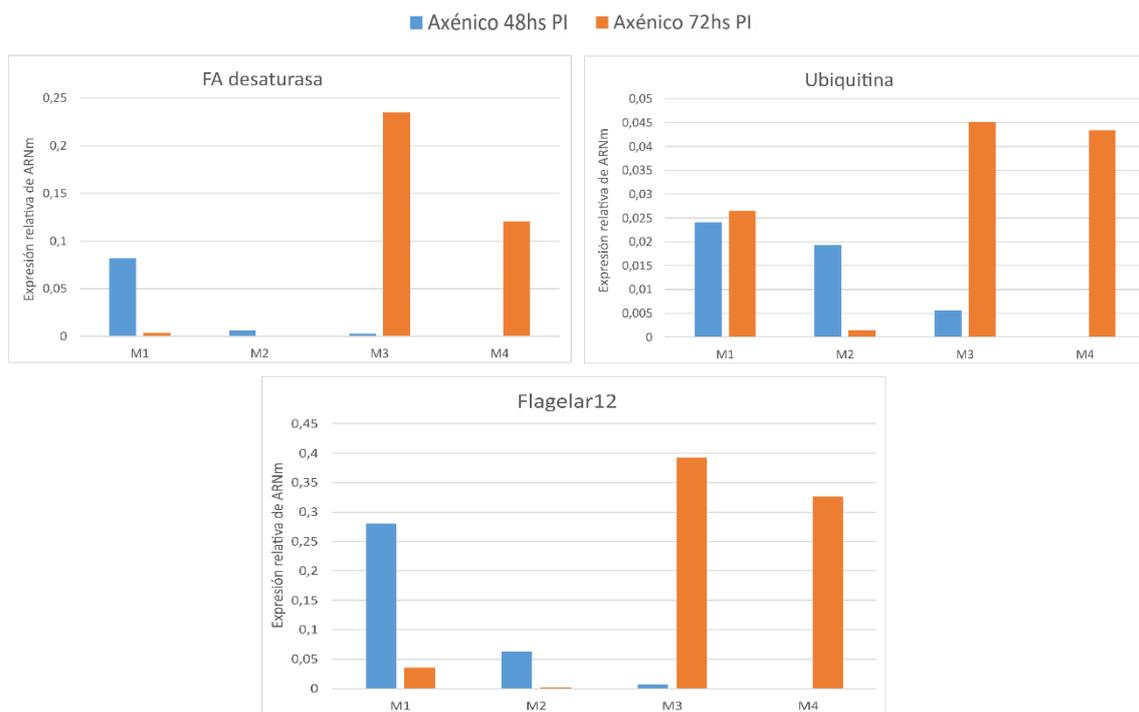


**Figura 18** - Expresión relativa a *gadh* de los ARNm codificados para diferentes proteínas usadas como marcadores del estadio intracelular. Los valores de expresión para los amastigotas axénicos fueron normalizados al valor de expresión para los amastigotas celulares (valor 1 – indicado con una línea roja). En el eje de las x se representan los 4 medios de diferenciación utilizados (M1: hgDMEM pH 4 sin FBS, M2: hgDMEM pH 5 sin FBS, M3: hgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS, M4: IgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS). Las barras azules corresponden a los amastigotas axénicos de 48hs post incubación y las barras naranjas corresponden a los amastigotas axénicos de 72hs post incubación.

Se observó que para genes vinculados a la replicación y proliferación como Histona H4 y PCNA, los medios M2 y M4 fueron los que más se acercaron al perfil de los celulares. Un perfil similar se observa para la amastina. En cuanto a los genes implicados en la respuesta oxidativa

como peroxidoxin y triparredoxin peroxidasa, a excepción del M2, todos los medios parecen haber alcanzado el nivel de los celulares. Incluso, M3 y M4 (medios a los cuales se le adicionó BSA) duplicaron el valor de expresión relativa de los celulares (**Figura 18**).

Para los genes que fueron seleccionados involucrados en el metabolismo de lípidos y del proteasoma, los resultados muestran que todos los medios aún se encuentran muy por debajo del valor de expresión para los celulares (**Figura 19**). Sin embargo, se pueden observar ciertas diferencias entre ellos. Los medios M1, M3 y M4 son los que alcanzan valores de expresión relativa más altos para la FA desaturasa (metabolismo lipídico). En cuanto al metabolismo del proteasoma, el perfil es menos claro, donde M3 y M4 presentan una expresión mayor para la enzima conjugadora de ubiquitina. Igualmente, dado que estas vías están siendo muy poco activadas en axénicos, los valores obtenidos de expresión relativa con respecto a celulares son todos muy bajos. Por lo tanto, las comparaciones anteriores deben tomarse con precaución ya que las diferencias entre los medios son mínimas.



**Figura 19** - Expresión relativa a gadph de los ARNm codificados para diferentes proteínas usadas como marcadores del estadio intracelular. Los valores de expresión para los amastigotas axénicos fueron normalizados al valor de expresión para los amastigotas celulares (valor 1 – indicado con una línea roja). En el eje de las x se representan los 4 medios de diferenciación utilizados (M1: hgDMEM pH 4 sin FBS, M2: hgDMEM pH 5 sin FBS, M3: hgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS, M4: lgDMEM + BSA 0,4% pH 5 sin FBS). Las

barras azules corresponden a los amastigotas axénicos de 48hs post incubación y las barras naranjas corresponden a los amastigotas axénicos de 72hs post incubación.

Con respecto al perfil que se observa para la proteína flagelar 12, el mismo es coherente con los resultados de los transcriptomas analizados anteriormente en los cuales se observaron algunos genes flagelares sobreexpresados en amastigotas celulares. Como discutimos esto puede deberse a que los parásitos intracelulares a 72 hpi hayan comenzado la activación de proteínas flagelares propios del estadio tripomastigota posterior. Por lo tanto, en los axénicos no esperamos esta activación. (**Figura 19**).

Teniendo en cuenta todos estos resultados, creemos que los medios M2 y M4 son los más prometedores para continuar los estudios.

## 8 Conclusiones y perspectivas

### 8.1 Conclusiones

En este trabajo se realiza la caracterización transcriptómica de amastigotas axénicas obtenidos mediante un protocolo de amastigogénesis secundaria axénica no antes descrita.

Esta caracterización se realizó de forma comparativa con amastigotas intracelulares. Comprobamos que estos últimos presentaban los perfiles de expresión génica correspondientes al estadio amastigota, permitiendo una comparativa exhaustiva entre ambos modelos.

Pudimos corroborar que el modelo axénico recapitula solo parcialmente el perfil de expresión génica observado para los amastigotas celulares. Si bien en los amastigotas axénicos no se observan procesos sobrerrepresentados específicamente vinculados a la división celular, si se logran identificar genes involucrados en el metabolismo de ácidos nucleicos y en la regulación del ciclo celular. Esto junto con otros resultados descritos anteriormente podría estar indicando que estamos en etapas tempranas de activación del ciclo celular, explicando la ausencia de procesos importantes para el amastigota replicativo. Dicho esto, se puede confirmar que características propias del proceso de amastigogénesis como la regulación negativa de proteínas de superficie y flagelares propias de tripomastigotas, ocurren en las primeras etapas de la diferenciación hacia el amastigota. Asimismo, visto que en los amastigotas axénicos se observa una disminución completa de genes flagelares, posiblemente la aparición del flagelo sea una de las primeras señales en activarse para la diferenciación hacia tripomastigota, así como también la pérdida del flagelo sea uno de los primeros indicios de diferenciación en amastigotas tempranos y una de las primeras señales en activarse para la amastigogénesis.

En base a los resultados obtenidos y resumiendo todas las características analizadas, se describe al amastigota axénico resultante como un estadio intermedio o una fase inicial que aún se encuentra en las primeras etapas de diferenciación.

El método utilizado en este trabajo es sencillo, rápido y no requiere de la acidificación del medio. Aunque los amastigotas axénicos resultantes no representan completamente el fenotipo celular, podrían ser un buen modelo de estudio para ciertos objetivos específicos como por ejemplo el estudio de glicoproteínas de superficie o de diferenciación del flagelo.

## 8.2 Perspectivas

Como perspectivas inmediatas se plantea terminar con la valoración de los distintos protocolos alternativos de amastigogenesis axénica, y elegir, en función de la expresión diferencial de genes marcadores característicos del estadio intracelular, el o los protocolos más representativos de este estadio para luego caracterizar sus perfiles transcriptómicos realizando un análisis bioinformático de los datos similar al descrito en este trabajo.

De acuerdo con los resultados que se obtengan, se valorará si es pertinente realizar otras modificaciones de los protocolos de forma de continuar con la optimización de los mismos.

Con estos resultados se busca aportar a la comunidad con protocolos adecuados y validados de amastigogenesis axénica para el uso de estos parásitos como modelo biológico.

## 9 Referencias bibliográficas

- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 31, 166-169.
- Aphasizhev, R., Aphasizheva, I., 2014. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie* 100, 125-131.
- Atwood, J.A., Weatherly, D.B., Minning, T.A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F.R., Orlando, R., Tarleton, R.L., 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science (New York, N.Y.)* 309, 473-476.
- Avila, A.R., Dallagiovanna, B., Yamada-Ogatta, S.F., Monteiro-Góes, V., Fragoso, S.P., Krieger, M.A., Goldenberg, S., 2003. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genetics and molecular research : GMR* 2, 159-168.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S., 2003. The trypanosomiases. *Lancet (London, England)* 362, 1469-1480.
- Batista, C.M.K., R. L.; Eger, I.; Soares, M. J., 2015. *Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reserosomes. *PloS one* 10, e0130165.
- Benabdellah, K., González-Rey, E., González, A., 2007. Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Molecular microbiology* 65, 1559-1567.
- Berens, R.L., Marr, J.J., LaFon, S.W., Nelson, D.J., 1981. Purine metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 3, 187-196.
- Berg, M., Van der Veken, P., Goeminne, A., Haemers, A., Augustyns, K., 2010. Inhibitors of the Purine Salvage Pathway: A Valuable Approach for Antiprotozoal Chemotherapy? *Current medicinal chemistry* 17, 2456-2481.
- Berna, L., Chiribao, M.L., Greif, G., Rodriguez, M., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2017. Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. *PeerJ* 5, e3017.
- Berná, L., Rodriguez, M., Chiribao, M.L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2018. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microbial genomics* 4.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron,

- A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E., El-Sayed, N.M., 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, N.Y.)* 309, 416-422.
- Burleigh, B.A., Andrews, N.W., 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 49, 175-200.
- Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Frasch, A.C., Di Noia, J.M., 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol* 4, 229-236.
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J. M., 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and infection* 5, 419-427.
- Caradonna, K.L., Burleigh, B.A., 2011. Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 76, 33-61.
- Caradonna, K.L., Engel, J.C., Jacobi, D., Lee, C.H., Burleigh, B.A., 2013. Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell host & microbe* 13, 108-117.
- Cavalcanti, D.P., Shimada, M.K., Probst, C.M., Souto-Pradón, T.C., de Souza, W., Goldenberg, S., Fragoso, S.P., Motta, M.C., 2009. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC microbiology* 9, 120.
- Clayton, C., 2013. The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. *PLoS Pathog* 9, e1003680.
- Contreras, V.T., Navarro, M.C., De Lima, A.R., Arteaga, R., Duran, F., Askue, J., Franco, Y., 2002. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 1213-1220.
- Cruz, M.C., Souza-Melo, N., da Silva, C.V., Darocha, W.D., Bahia, D., Araujo, P.R., Teixeira, S.R., Mortara, R.A., 2012. *Trypanosoma cruzi*: role of delta-amastin on extracellular amastigote cell invasion and differentiation. *PLoS one* 7, e51804.

- Chiribao, M.L., Libisch, M.G., Osinaga, E., Parodi-Talice, A., Robello, C., 2012. Cloning, localization and differential expression of the *Trypanosoma cruzi* TcOGNT-2 glycosyl transferase. *Gene* 498, 147-154.
- da Silva Augusto, L., Moretti, N.S., Ramos, T.C., de Jesus, T.C., Zhang, M., Castilho, B.A., Schenkman, S., 2015. A membrane-bound eIF2 alpha kinase located in endosomes is regulated by heme and controls differentiation and ROS levels in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 11, e1004618.
- de Carvalho, T.U., de Souza, W., 1986. Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28, 205-212.
- De Gaudenzi, J.G., Carmona, S.J., Aguero, F., Frasch, A.C., 2013. Genome-wide analysis of 3'-untranslated regions supports the existence of post-transcriptional regulons controlling gene expression in trypanosomes. *PeerJ* 1, e118.
- De Gaudenzi, J.G., D'Orso, I., Frasch, A.C., 2003. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *The Journal of biological chemistry* 278, 18884-18894.
- De Pablos, L.M., Osuna, A., 2012. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect Immun* 80, 2258-2264.
- de Souza, W., de Carvalho, T.M., Barrias, E.S., 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol* 2010.
- Deeks, E.D., 2019. Fexinidazole: First Global Approval. *Drugs* 79, 215-220.
- Dias-Lopes, G., Zabala-Peñafiel, A., de Albuquerque-Melo, B.C., Souza-Silva, F., Menaguali do Canto, L., Cysne-Finkelstein, L., Alves, C.R., 2021. Axenic amastigotes of *Leishmania* species as a suitable model for in vitro studies. *Acta tropica* 220, 105956.
- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M.L., Libisch, M.G., Robello, C., 2023. Genome-wide chromatin interaction map for *Trypanosoma cruzi*. *Nature microbiology* 8, 2103-2114.
- Duhagon, M.A., Dallagiovanna, B., Garat, B., 2001. Unusual features of poly[dT-dG].[dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of *Trypanosoma cruzi* genome. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 98-103.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R.,

- McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, N.Y.)* 309, 409-415.
- Elias, M.C., Marques-Porto, R., Freymuller, E., Schenkman, S., 2001. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Molecular and biochemical parasitology* 112, 79-90.
- Engel, J.C., Franke de Cazzulo, B.M., Stoppani, A.O., Cannata, J.J., Cazzulo, J.J., 1987. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. *Molecular and biochemical parasitology* 26, 1-10.
- Estrada, D., Specker, G., Martínez, A., Dias, P.P., Hissa, B., Andrade, L.O., Radi, R., Piacenza, L., 2018. Cardiomyocyte diffusible redox mediators control *Trypanosoma cruzi* infection: role of parasite mitochondrial iron superoxide dismutase. *The Biochemical journal* 475, 1235-1251.
- Fernández, D., Wenck, M.A., Craig, S.P., 3rd, Delfino, J.M., 2004. The purine transferase from *Trypanosoma cruzi* as a potential target for bisphosphonate-based chemotherapeutic compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 14, 4501-4504.
- Franchin, G., Pereira-Chioccola, V.L., Schenkman, S., Rodrigues, M.M., 1997. Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infect Immun* 65, 2548-2554.
- Frasch, A.C., 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today (Personal ed.)* 16, 282-286.
- Freitas, L.M., dos Santos, S.L., Rodrigues-Luiz, G.F., Mendes, T.A., Rodrigues, T.S., Gazzinelli, R.T., Teixeira, S.M., Fujiwara, R.T., Bartholomeu, D.C., 2011. Genomic analyses, gene expression and antigenic profile of the trans-sialidase superfamily of *Trypanosoma cruzi* reveal an undetected level of complexity. *PloS one* 6, e25914.
- Freymann, D.M., Wenck, M.A., Engel, J.C., Feng, J., Focia, P.J., Eakin, A.E., Craig, S.P., 2000. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. *Chemistry & biology* 7, 957-968.

- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *The Journal of experimental biology* 201, 1203-1209.
- Garzoni, L.R., Masuda, M.O., Capella, M.M., Lopes, A.G., de Meirelles Mde, N., 2003. Characterization of  $[Ca^{2+}]_i$  responses in primary cultures of mouse cardiomyocytes induced by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 487-493.
- Giorgi, M.E., de Lederkremer, R.M., 2011. Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: an important interplay for the parasite. *Carbohydr Res* 346, 1389-1393.
- Gutteridge, W.E., Gaborak, M., 1979. A re-examination of purine and pyrimidine synthesis in the three main forms of *Trypanosoma cruzi*. *The International journal of biochemistry* 10, 415-422.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., Michels, P.A., 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11.
- Hannaert, V., Michels, P.A., 1994. Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J Bioenerg Biomembr* 26, 205-212.
- Hernandez-Osorio, L.A., Marquez-Duenas, C., Florencio-Martinez, L.E., Ballesteros-Rodea, G., Martinez-Calvillo, S., Manning-Cela, R.G., 2010. Improved method for in vitro secondary amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: morphometrical and molecular analysis of intermediate developmental forms. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 283842.
- Hickson, J., Athayde, L.F.A., Miranda, T.G., Junior, P.A.S., Dos Santos, A.C., da Cunha Galvão, L.M., da Câmara, A.C.J., Bartholomeu, D.C., de Souza, R.C.M., Murta, S.M.F., Nahum, L.A., 2022. *Trypanosoma cruzi* iron superoxide dismutases: insights from phylogenetics to chemotherapeutic target assessment. *Parasites & vectors* 15, 194.
- Hoffmann, A.J., M.; Ochsenreiter, T., 2016. A novel component of the mitochondrial genome segregation machinery in trypanosomes. *Microb Cell* 3, 352-354.
- Iantorno, S.A., Durrant, C., Khan, A., Sanders, M.J., Beverley, S.M., Warren, W.C., Berriman, M., Sacks, D.L., Cotton, J.A., Grigg, M.E., 2017. Gene Expression in *Leishmania* Is Regulated Predominantly by Gene Dosage. *mBio* 8.
- Inoue, N., Otsu, K., Ferraro, D.M., Donelson, J.E., 2002. Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. *Molecular and biochemical parasitology* 120, 309-313.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzým, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K.,

- Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B., Myler, P.J., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science (New York, N.Y.)* 309, 436-442.
- Keder, A., Carmena, A., 2013. Cytoplasmic protein motility and polarized sorting during asymmetric cell division. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* 2, 797-808.
- Keene, J.D., 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8, 533-543.
- Kitagawa, M., Lee, S.H., 2015. The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Frontiers in cell and developmental biology* 3, 14.
- Kramer, S., 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Molecular and biochemical parasitology* 181, 61-72.
- Krauth-Siegel, R.L., Comini, M.A., 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochimica et biophysica acta* 1780, 1236-1248.
- Krieger, M.A., Avila, A.R., Ogatta, S.F., Plazanet-Menut, C., Goldenberg, S., 1999. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 165-168.
- Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A.T., Choi, J., Caradonna, K.L., Padmanabhan, P., Ndegwa, D.M., Temanni, M.R., Corrada Bravo, H., El-Sayed, N.M., Burleigh, B.A., 2016. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathog* 12, e1005511.
- Li, Z., Umeyama, T., Wang, C.C., 2008. The chromosomal passenger complex and a mitotic kinesin interact with the Tousled-like kinase in trypanosomes to regulate mitosis and cytokinesis. *PLoS one* 3, e3814.

- Lima, A.R.J., Silva, H.G.S., Poubel, S., Rosón, J.N., de Lima, L.P.O., Costa-Silva, H.M., Gonçalves, C.S., Galante, P.A.F., Holetz, F., Motta, M.C.M., Silber, A.M., Elias, M.C., da Cunha, J.P.C., 2022. Open chromatin analysis in *Trypanosoma cruzi* life forms highlights critical differences in genomic compartments and developmental regulation at tDNA loci. *Epigenetics & chromatin* 15, 22.
- Magdesian, M.H., Giordano, R., Ulrich, H., Juliano, M.A., Juliano, L., Schumacher, R.I., Colli, W., Alves, M.J., 2001. Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. *The Journal of biological chemistry* 276, 19382-19389.
- Malik, L.H., Singh, G.D., Amsterdam, E.A., 2015. Chagas Heart Disease: An Update. *The American journal of medicine* 128, 1251.e1257-1259.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela, R.G., Figueroa-Angulo, E.E., 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 525241.
- Medina, C.M., Ferreira É, R., Bonifácio, B.S., Mortara, R.A., Bonfim-Melo, A., 2021. *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes engage Rac1 and Cdc42 to invade RAW macrophages. *Microbes and infection* 23, 104837.
- Michels, P.A., Hannaert, V., Bringaud, F., 2000. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitology today (Personal ed.)* 16, 482-489.
- Michels, P.A., Moyersoén, J., Krazy, H., Galland, N., Herman, M., Hannaert, V., 2005. Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes (review). *Molecular membrane biology* 22, 133-145.
- Minning, T.A., Bua, J., Garcia, G.A., McGraw, R.A., Tarleton, R.L., 2003. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 131, 55-64.
- Minning, T.A., Weatherly, D.B., Atwood, J., 3rd, Orlando, R., Tarleton, R.L., 2009. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 10, 370.
- Morita, Y.S., Acosta-Serrano, A., Buxbaum, L.U., Englund, P.T., 2000. Glycosyl phosphatidylinositol myristoylation in African trypanosomes. New intermediates in the pathway for fatty acid remodeling. *The Journal of biological chemistry* 275, 14147-14154.
- Nakajima-Shimada, J., Hirota, Y., Aoki, T., 1996. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40, 2455-2458.

- Navarro, M.C., De Lima, A.R., Askue, J., Contreras, V.T., 2003. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 83-91.
- Nunes, M.C., Dones, W., Morillo, C.A., Encina, J.J., Ribeiro, A.L., Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of, C., 2013. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 767-776.
- Opperdoes, F.R., Borst, P., 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* 80, 360-364.
- OPS, 2021. Organización Panamericana de la Salud.
- Ouellette, M., Papadopoulou, B., 2009. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. *J Biol* 8, 100.
- PAHO 2021. Pan American Health Organization.
- Palenchar, J.B., Liu, W., Palenchar, P.M., Bellofatto, V., 2006. A divergent transcription factor TFIIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryot Cell* 5, 293-300.
- Parsons, M., 2004. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Molecular microbiology* 53, 717-724.
- Pastro, L., Smircich, P., Di Paolo, A., Becco, L., Duhagon, M.A., Sotelo-Silveira, J., Garat, B., 2017. Nuclear Compartmentalization Contributes to Stage-Specific Gene Expression Control in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in cell and developmental biology* 5, 8.
- Pech-Canul, A.C., Monteon, V., Solis-Oviedo, R.L., 2017. A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res* 2017, 3751403.
- Perez-Diaz, L., Pastro, L., Smircich, P., Dallagiovanna, B., Garat, B., 2013. Evidence for a negative feedback control mediated by the 3' untranslated region assuring the low expression level of the RNA binding protein TcRBP19 in *T. cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 436, 295-299.
- Pérez-Molina, J.A., Crespillo-Andújar, C., Bosch-Nicolau, P., Molina, I., 2021. Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 39, 458-470.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Kelly, J.M., Wilkinson, S.R., Radi, R., 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical journal* 410, 359-368.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Martínez, A., Radi, R., 2013. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxidants & redox signaling* 19, 723-734.

- Portman, N., Gull, K., 2010. The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: from structure to components and function. *Int J Parasitol* 40, 135-148.
- Rangel-Aldao, R., Allende, O., Triana, F., Piras, R., Henriquez, D., Piras, M., 1987. Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 22, 39-43.
- Rassi, A., Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet (London, England)* 375, 1388-1402.
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., Aslund, L., 2008. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry* 283, 15884-15892.
- Rochette, A., McNicoll, F., Girard, J., Breton, M., Leblanc, E., Bergeron, M.G., Papadopoulou, B., 2005. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Molecular and biochemical parasitology* 140, 205-220.
- Rogerson, G.W., Gutteridge, W.E., 1980. Catabolic metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 10, 131-135.
- Schenkman, S., Pascoalino Bdos, S., Nardelli, S.C., 2011. Nuclear structure of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 75, 251-283.
- Shah-Simpson, S., Lentini, G., 2017. Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. 13, e1006747.
- Shapiro, T.A., Englund, P.T., 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 49, 117-143.
- Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S., Cross, G.A., 2009. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 23, 1063-1076.
- Silber, A.M., Colli, W., Ulrich, H., Alves, M.J., Pereira, C.A., 2005. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Current drug targets. Infectious disorders* 5, 53-64.
- Silber, A.M., Tonelli, R.R., Lopes, C.G., Cunha-e-Silva, N., Torrecilhas, A.C., Schumacher, R.I., Colli, W., Alves, M.J., 2009. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 168, 102-108.
- Simpson, L., 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 41, 363-382.
- Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M.A., Guerra-Slompo, E.P., Garat, B., Goldenberg, S., Munroe, D.J., Dallagiovanna, B., Holetz, F., Sotelo-Silveira, J.R., 2015. Ribosome

- profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 16, 443.
- Souza, W., 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 89-100.
- Sternlieb, T., Schoijet, A.C., Alonso, G.D., 2020. Intracellular cyclic AMP levels modulate differential adaptive responses on epimastigotes and cell culture trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica* 202, 105273.
- Swann, J., Jamshidi, N., Lewis, N.E., Winzeler, E.A., 2015. Systems analysis of host-parasite interactions. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 7, 381-400.
- Takagi, Y., Akutsu, Y., Doi, M., Furukawa, K., 2019. Utilization of proliferable extracellular amastigotes for transient gene expression, drug sensitivity assay, and CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13, e0007088.
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N.R., Campbell, D.A., Myler, P.J., 2009. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* 10, 152.
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology* 28, 85-104.
- Tomlinson, S., Raper, J., 1998. Natural human immunity to trypanosomes. *Parasitology today (Personal ed.)* 14, 354-359.
- Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U., Nussenzweig, V., 1995. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology* 110 ( Pt 5), 547-554.
- Tonelli, R.R., Augusto Lda, S., Castilho, B.A., Schenkman, S., 2011. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS one* 6, e27904.
- Villalta, F., Kierszenbaum, F., 1982. Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium. *The Journal of protozoology* 29, 570-576.
- Wang, W., Peng, D., Baptista, R.P., Li, Y., Kissinger, J.C., 2021. Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS Pathog* 17, e1009254.
- Westermann, A.J., Vogel, J., 2018. Host-Pathogen Transcriptomics by Dual RNA-Seq. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1737, 59-75.
- WHO 2018. World Health Organization - Chagas disease (American trypanosomiasis).
- WHO 2021. World Health Organization.
- Wilkinson, S.R., Kelly, J.M., 2003. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biological chemistry* 384, 517-525.

- Wilkinson, S.R., Temperton, N.J., Mondragon, A., Kelly, J.M., 2000. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry* 275, 8220-8225.
- Woolsey, A.M., Burleigh, B.A., 2004. Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cell Microbiol* 6, 829-838.
- Yoshida, N., Cortez, M., 2008. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem* 47, 82-91.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., Second Satellite, M., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054.

## 10 Anexo

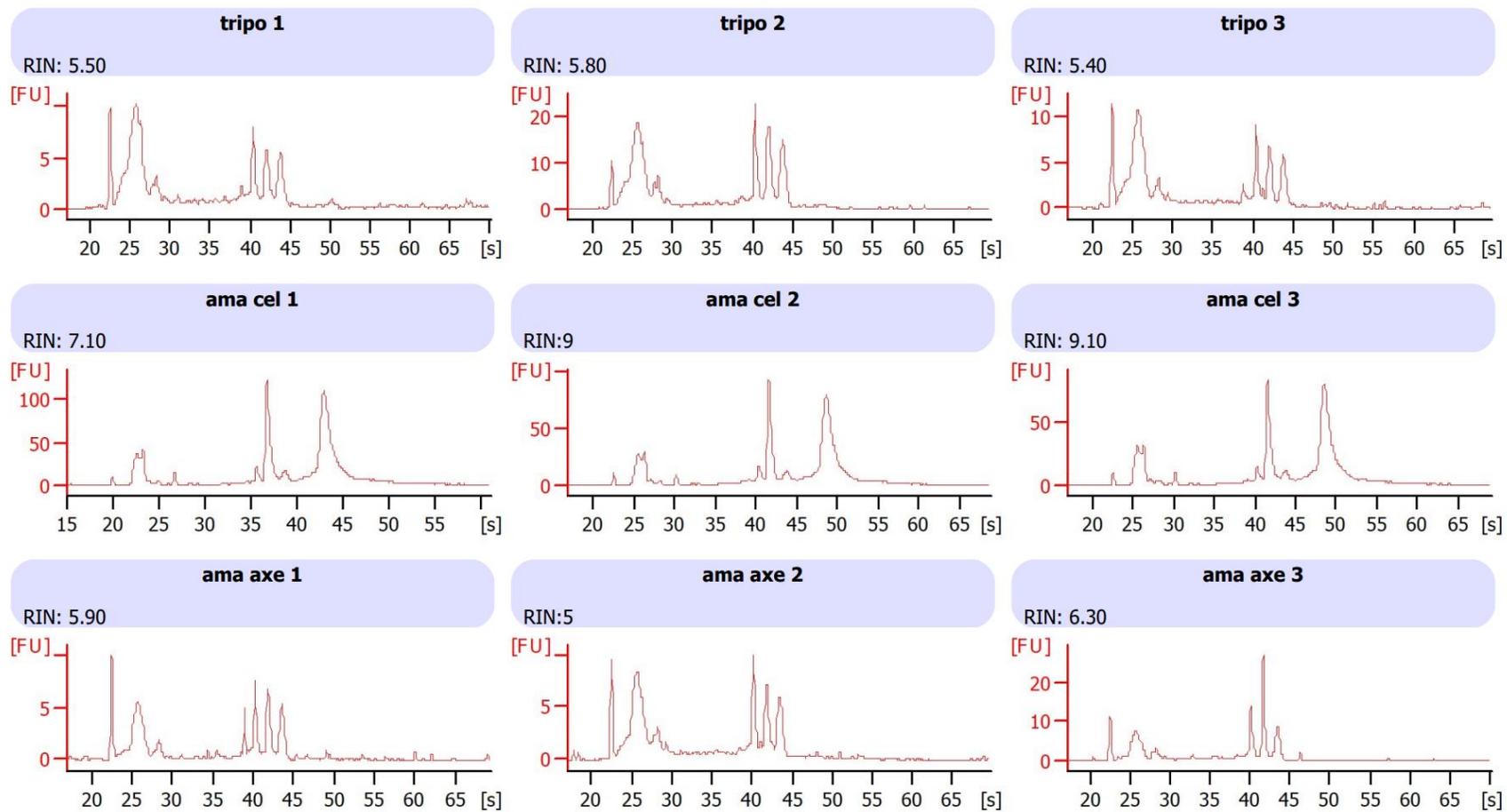
Nombre oligo	5' – secuencia oligo - 3'
Fw-PCNA	CGGACGAGCCTGTTACTCTC
Rv-PCNA	CAAACCTTCAGCGACACACGG
Fw-Histone H4	CGAGAACGTCCGTGGAATCA
Rv-Histone H4	CGTAGATGACCCGGAGATG
Fw-Tryparedoxin peroxidase	CCTCCTACAAGGGCAAGTGG
Rv-Tryparedoxin peroxidase	TCACACGGTCCGAGAATTGG
Fw-Peroxidoxin	TGTATCGTGCACAGCCAAT
Rv-Peroxidoxin	TAGTCGCGGGCAATTCCTT
Fw-3KCAThiolase	TGGCCTTAGCTGGCGTAAAA
Rv-3KCAThiolase	TAGTCGGCAATACCAAGGGC
Fw-FADesaturase	GGGTTTCGACAGATGGAA
Rv-FwFADesaturase	AACGTTGTCCCAATCACGA
Fw-PA26	CGCATGTCGCCGTATCTACT
Rv-PA26	ACATTTTCAGAACGGCGTGC
Fw-UbqEnzyme	GACCGCAAATGTCGGAAGTG
Rv-UbqEnzyme	ACCGCCTTTTTGGAAGCAAC
Fw-Flag12	AAGGACGACGAAGGTTTCCC
Rv-Flag12	GCCATCAATGTCGCATCAC

**Tabla 1.** Detalle de los *primers* utilizados para los genes diferenciales seleccionados



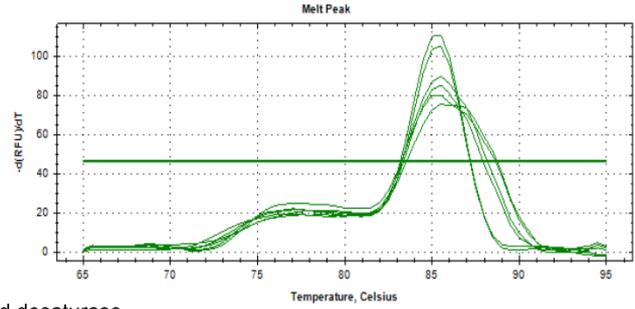
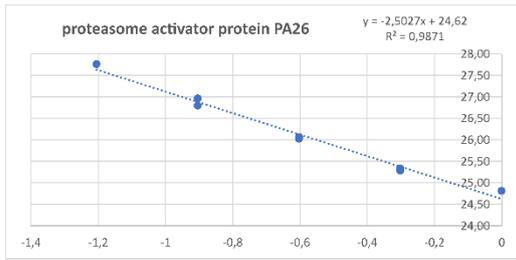
Amastigota axénico vs. Tripomastigota																	
SOBRE-EXPRESADOS																	
Proceso Biológico						Función Molecular					Compartimento Celular						
GO ID	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor	FC	GO	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor	FC	GO	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor	FC
0016125	procesos metabólicos de esteroides	5	46	7,1E-05	9,93	0015103	actividad transp. transm. aniones inorgánicos	4	40	7,25E-04	8,74	0046930	comlejo del poro	2	40	1,90E-02	8,74
0030497	elongación de ácidos grasos	3	43	2,89E-03	9,37	0009922	actividad elongasa de ácidos grasos	2	40	1,90E-02	8,74	0000793	chromosoma condensado	5	19	6,83E-03	4,05
0008204	procesos metabólicos de ergosterol	2	40	1,90E-02	8,74	0015288	actividad del poro	2	40	1,90E-02	8,74	0020015	glicosoma	15	11	1,21E-03	2,43
0015698	transporte de aniones inorgánicos	2	33	2,77E-02	7,29	0004312	actividad sintetasa de ácidos grasos	2	29	3,76E-02	6,24	0000785	cromatina	25	9	4,54E-04	2,05
0033955	herencia de ADN mitocondrial	2	33	2,77E-02	7,29	0008509	actividad transp. transmembrana aniones	5	25	1,71E-03	5,46	0020023	kinetoplasto	17	9	7,38E-03	1,92
0006220	procesos metabólicos de pirimidina	4	33	1,58E-03	7,29	0034061	actividad ADN polimerasa	4	21	9,66E-03	4,60	0005773	vacuola	16	9	1,04E-02	1,89
0098656	transporte transmembrana de aniones	3	30	8,95E-03	6,56	0016491	actividad oxidoreductasa	30	13	1,55E-07	2,85						
0006633	procesos biosintéticos de ácidos grasos	5	25	1,70E-03	5,46	0003677	unión a ADN	22	12	1,96E-05	2,69						
0006084	procesos metabólicos de acetyl-CoA	2	25	4,86E-02	5,46	0003774	actividad motora del citoesqueleto	10	10	1,57E-02	2,19						
0006260	replicación del ADN	13	21	3,28E-06	4,58												
0006839	transporte mitocondrial	5	19	6,80E-03	4,05												
0007059	segregación de cromosomas	5	17	9,32E-03	3,77												
0051276	organización de los cromosomas	13	15	1,43E-04	3,27												
0008610	procesos biosintéticos de lípidos	14	14	1,80E-04	3,03												
0009117	procesos metabólicos de nucleótidos	12	12	1,46E-03	2,70												
0000278	ciclo celular mitótico	5	12	3,78E-02	2,67												
0006950	respuesta a estrés	11	8	4,07E-02	1,81												
SUB-EXPRESADOS																	
Proceso Biológico						Función Molecular					Compartimento Celular						
GO ID	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor	FC	GO	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor	FC	GO	Nombre	# de genes	% genes del total	p-valor	FC
0060294	movimiento ciliar (movilidad celular)	5	100	1,73E-05	8,94	0015149	actividad transporte transmembrana de hexosa	3	100	1,39E-03	8,94	0001534	estructura proteina flagelar	2	100	1,25E-02	8,94
1904659	transporte transmembrana de glucosa	3	100	1,39E-03	8,94	0005355	actividad transporte transmembrana de glucosa	3	100	1,39E-03	8,94	0030313	envoltura celular	7	78	6,26E-06	6,96
0008645	transporte transmembrana de hexosa	3	100	1,39E-03	8,94	0003923	actividad transamidasa de anclaje GPI	3	75	5,11E-03	6,71	0009986	superficie celular	297	59	3,56E-159	5,29
0034219	transporte transmembrana de carbohidratos	3	100	1,39E-03	8,94	0015144	actividad trans. transporte de carbohidratos	3	50	2,15E-02	4,47	0031514	cilia móvil	12	32	4,57E-04	2,90
0043056	locomoción	2	100	1,25E-02	8,94	0004222	actividad metaloendopeptidasa	21	26	2,68E-04	2,35	0005856	citoesqueleto	92	17	4,94E-06	1,56
0006486	glicosilación proteica	19	41	1,48E-07	3,69	0016757	actividad glicotransferasa	15	24	8,52E-03	2,16						
0009100	metabolismo de glicoproteínas	19	41	1,48E-07	3,69	0004175	actividad endopeptidasa	32	21	6,02E-03	1,88						
0009101	proceso biosintético de glicoproteínas	19	41	1,48E-07	3,69												
0007155	adhesión celular	21	30	1,87E-05	2,64												
0051674	localización celular	13	30	7,36E-04	2,64												

**Tabla 3.** Términos de Ontología Génica (GO) para genes diferencialmente expresados en amastigotas axénicos cuando son comparados con tripomastigotas. Se detallan aquellos procesos sobrerrepresentados (panel superior) y subrepresentados (panel inferior) de acuerdo con las tres clasificaciones clásicas de GO. Para esto se utilizó TriTrypDB.

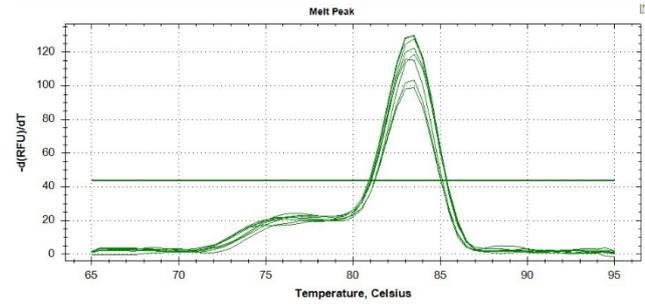
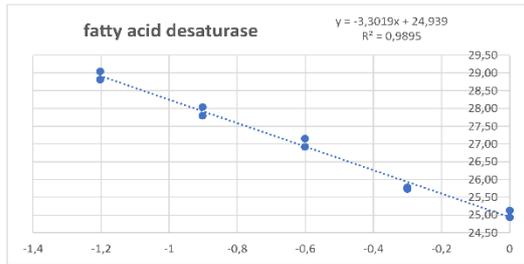


**Figura 1** – Resumen de los electroferogramas para los perfiles de ARN. De arriba hacia abajo: Tripomastigotas, amastigotas celulares y amastigotas axénicos. Fueron corridas en un Chip RNA Nano 6000 (Agilent 2100 Bioanalyzer).

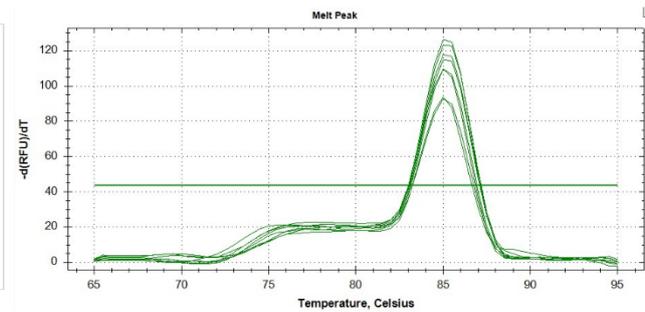
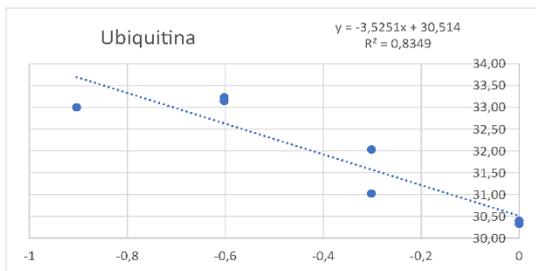
Proteasome activator protein



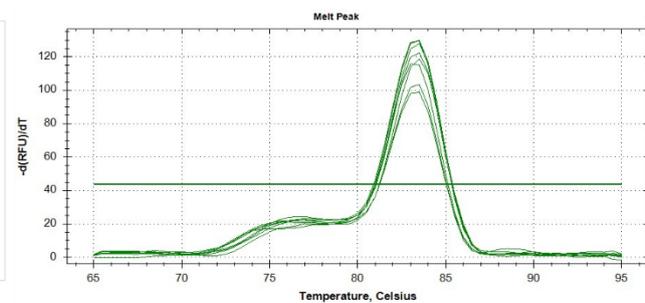
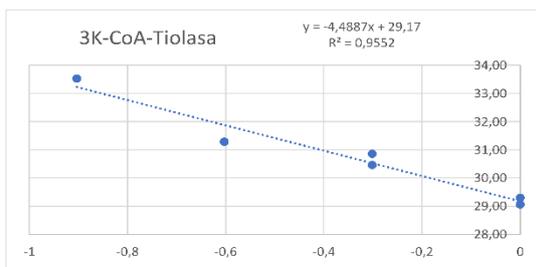
Fatty acid desaturase



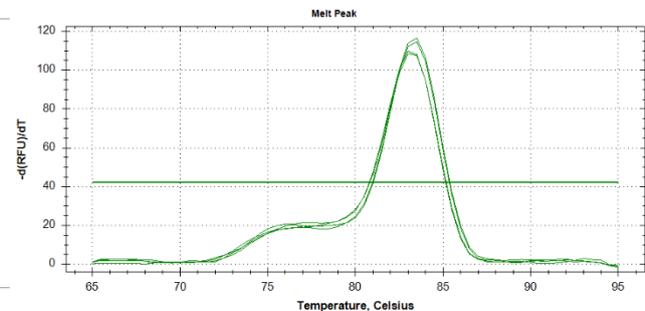
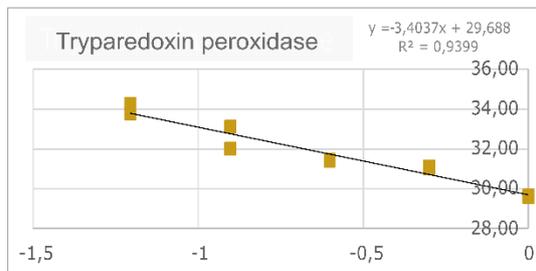
Ubiquitin-conjugating enzyme



3K-CoA-Tiolasa

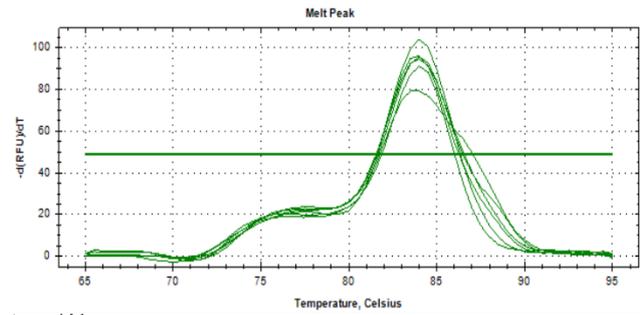
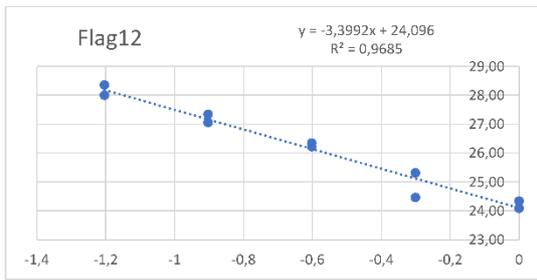


Tryparedoxin peroxidase

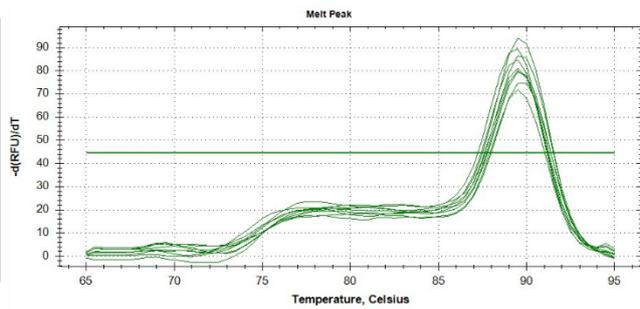
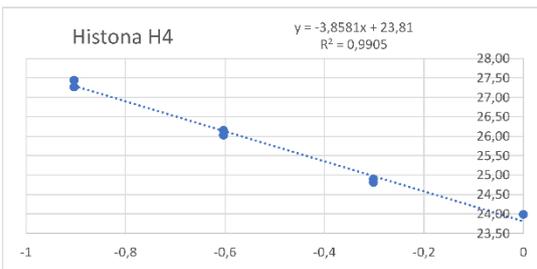


**Figura 2** – Evaluación de las eficiencias de los primers seleccionados. Curvas de *melting* y gráfico  $C_T$  vs log concentración para la proteína activadora del proteasoma, desaturasa de ácidos grasos, enzima conjugadora de ubiquitina, cetoacil-CoA tiolasa y triparedoxin peroxidasa.

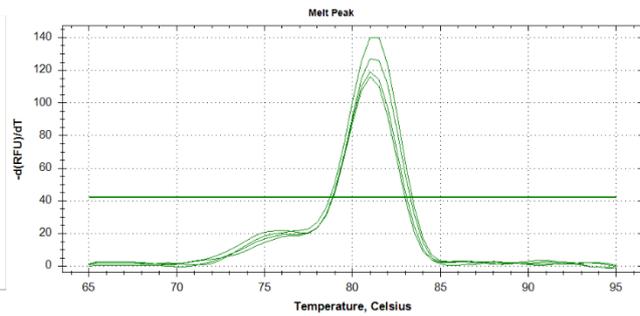
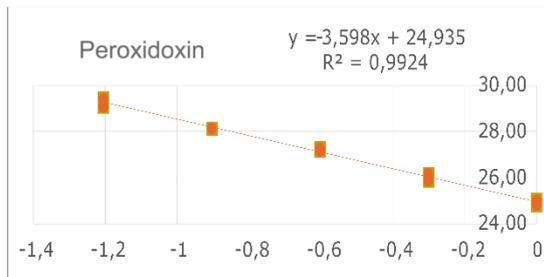
Flagellum attachment zone protein 12



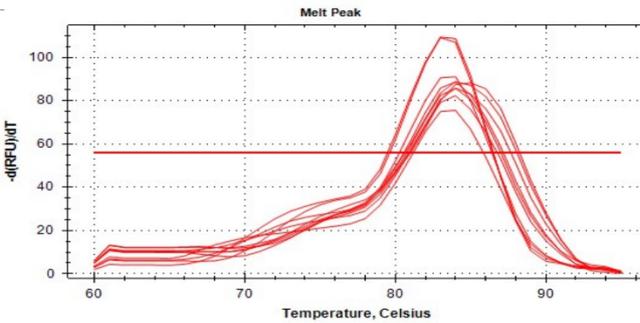
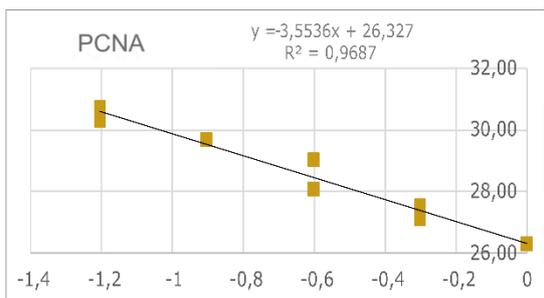
Histone H4



Peroxidoxin

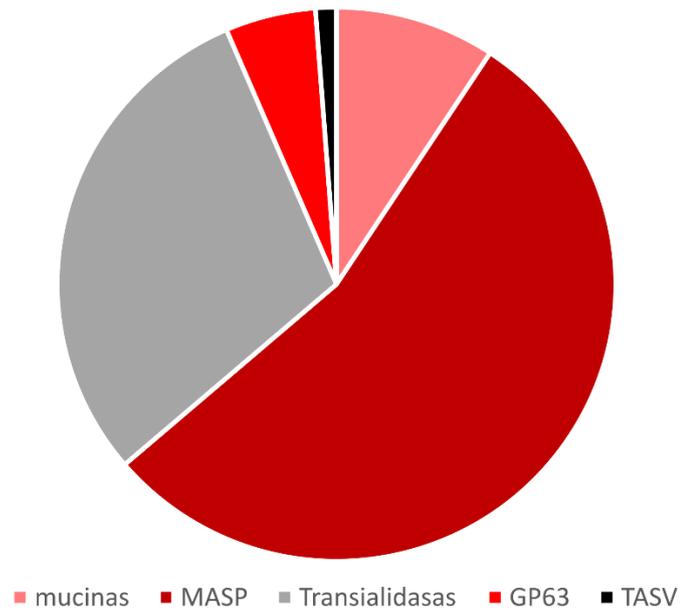


Proliferative cell nuclear antigen



**Figura 3** - Evaluación de las eficiencias de los primers seleccionados. Curvas de melting y gráfico  $C_t$  vs log concentración para la proteína 12 de la zona de unión al flagelo, histona H4, peroxidoxin y antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA).

Proteínas reguladas negativamente en común  
para ambos amastigotas



**Figura 4** – Descripción de los grupos de genes regulados negativamente que comparten ambos amastigotas cuando son comparados con los tripomastigotas celulares. Para la comparación se utilizó un  $\log_2FC$  de  $|0,58|$ .