



# Compuestos metálicos anti - *Trypanosoma cruzi*: evaluación celular y transcriptómica

Lic. María Florencia Mosquillo

Orientadora: Dra. Leticia Pérez Díaz

Co-orientador: Dr. Pablo Smircich

Tesis de Maestría

PEDECIBA - Área Biología

Laboratorio de Interacciones Moleculares

Facultad de Ciencias - Universidad de la República

Octubre de 2017



---

*Muchas gracias...*

*A mi familia, por su amor y apoyo constante.*

*A Juan, por tanto amor y paciencia.*

*A Mari, Cami y Piria por las horas felices.*

*A mis amigos de Facultad y de la banda del Paño, por tantos buenos momentos.*

*A todo el LIM. A Bea, Leti y Pablo por la oportunidad y por confiar en mí una vez más. A Lu, Lore, María Ana, Rafa, Chaveta, Santi, Caro, Ceci y Martín por todos sus consejos y valiosos aportes. Al LIM joven, Fabricio, Meche, Lu y Juan, por la buena onda de siempre, es un gusto trabajar con todos ustedes.*

*A las agencias financiadoras, ANII, CSIC y PEDECIBA por apoyar este proyecto.*

*Al tribunal, por aceptar evaluar este trabajo.*

*A todos los que me acompañaron estos años, ¡GRACIAS!*

# Índice

---

Abreviaturas .....	7
Resumen.....	8
<b>1. Introducción y antecedentes .....</b>	<b>10</b>
1.1 Introducción .....	10
1.1.1 Características de la enfermedad de Chagas .....	10
1.1.2 Epidemiología y estado actual del tratamiento .....	11
1.1.3 Generalidades de <i>T. cruzi</i> .....	15
1.1.4 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	18
1.1.5 Organización genómica de <i>T. cruzi</i> .....	21
1.1.6 Transcripción y maduración de ARNm .....	23
1.1.7 Regulación de la expresión génica .....	24
1.1.8 Mecanismos de muerte celular en <i>T. cruzi</i> .....	25
1.1.9 Compuestos metálicos como potenciales agentes antichagásicos.....	26
1.2 Antecedentes .....	30
<b>2. Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>31</b>
2.1 Hipótesis.....	31
2.2 Objetivo general .....	31
2.3 Objetivos específicos.....	31
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>32</b>
3.1 Soluciones y tampones.....	32
3.2 Medios de cultivo .....	32
3.3 Cepas .....	32
3.4 Determinación del IC <sub>50</sub> sobre <i>T. cruzi</i> .....	32
3.5 Determinación del IC <sub>50</sub> sobre células VERO .....	33
3.6 Recuperación de parásitos .....	34
3.7 Índice de captura.....	34
3.8 Asociación a macromoléculas .....	35
3.9 Microscopía de campo claro .....	35
3.10 Tinción con Anexina V / Ioduro de propidio.....	36
3.11 Tinción con Calceína-AM / Ioduro de propidio .....	38
3.12 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	40

---

3.13 Extracción de ARN de <i>T. cruzi</i> .....	41
3.14 Cuantificación de ARN.....	41
3.15 RNA-Seq.....	42
3.16 Análisis bioinformáticos.....	42
3.17 Retrotranscripción de ARN mensajero.....	44
3.18 PCR en tiempo real.....	44
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>46</b>
4.1 Actividad <i>in vitro</i> anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	46
4.1.1 Determinación del IC <sub>50</sub> de compuestos metálicos.....	46
4.1.2 Recuperación de parásitos.....	49
4.1.3 Índice de captura.....	50
4.1.4 Asociación a macromoléculas.....	53
4.2 Evaluación celular.....	54
4.2.1 Microscopía de campo claro.....	54
4.2.2 Tipo de muerte celular.....	55
4.2.3 Actividad metabólica celular.....	58
4.2.4 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).....	60
4.3 Análisis transcriptómico.....	63
4.3.1 Calidad de las muestras.....	64
4.3.2 Secuenciación.....	65
4.3.3 Calidad de las secuencias.....	66
4.3.4 Mapeo de las secuencias.....	68
4.3.5 Conteo de secuencias.....	68
4.3.6 Análisis de expresión diferencial.....	69
4.3.7 Análisis de los genes regulados.....	70
4.3.8 Análisis de ontología génica, clases enzimáticas y vías metabólicas.....	74
4.4 PCR en tiempo real.....	80
<b>5. Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>84</b>
5.1 Conclusiones.....	84
5.2 Perspectivas.....	85
<b>6. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>87</b>
<b>7. Anexo.....</b>	<b>100</b>
7.1 Bioanalyzer 2100 expert Eukaryote Total RNA Nano.....	100

---

7.2 Calidad de las secuencias de RNA-Seq .....	103
7.3 Lista de genes sobre-expresados ( $\log_2 FC > 0,5$ ; $FDR < 0,01$ ) .....	105
7.4 Lista de genes sub-expresados ( $\log_2 FC < -0,5$ ; $FDR < 0,01$ ) .....	109
7.5 Lista de términos GO de genes sobre-expresados .....	114
7.6 Lista de términos GO de genes sub-expresados .....	117
7.7 Curvas de eficiencia y de <i>melting</i> de los cebadores de RT-PCR .....	124

## Abreviaturas

---

°C	Grado Celsius
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNsa	Desoxirribonucleasa
ARN	Ácido ribonucleico
AV	Anexina V
BHI	Brain-Heart Infusion
Bz	Benznidazol
CA	Calceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleósido -5' - trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
fg	femtogramo
g	Aceleración de la gravedad terrestre
h	Horas
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria del 50%
IP	Ioduro de propidio
IS	Índice de selectividad
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide
kb	Kilobases
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
Nfx	Nifurtimox
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino de fosfato
SFB	Suero fetal bovino
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
TA	Temperatura ambiente
Tm	Temperatura de fusión

## Resumen

---

La enfermedad de Chagas es una zoonosis potencialmente letal que afecta principalmente a la población rural y marginal de Latinoamérica. Su agente etiológico es el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, un organismo unicelular digenético que se transmite al hospedero mamífero, en el que se desarrolla la patología, a través de insectos triatomíneos hematófagos que funcionan como vectores. No existen vacunas disponibles ni una farmacoterapia adecuada para el tratamiento de esta enfermedad. Por esto ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud, como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas debido a la baja inversión histórica por parte de la industria farmacéutica. En consecuencia, los esfuerzos para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad provienen principalmente del ámbito académico. Los tratamientos actuales se basan en dos fármacos desarrollados décadas atrás y de amplio espectro, Benznidazol y Nifurtimox. Estas quimioterapias son inadecuadas, tóxicas y presentan varias contraindicaciones, y la aparición de cepas resistentes remarca la necesidad de desarrollar nuevos fármacos. Los complejos basados en metales han demostrado ser un enfoque prometedor contra las enfermedades parasitarias y este estudio tiene como objetivo lograr avances en la búsqueda de compuestos eficaces. En el presente trabajo se estudió el efecto de nuevos compuestos de platino, paladio y vanadio sobre la cepa CL Brener de *T. cruzi*. El compuesto basado en platino, un hexafluorofosfato 1,1'-bis (difenílfosfino) ferroceno piridina-2-tiolato-1-óxido Pt (II), Pt-dppf-mpo, expuso un valor de IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar y un excelente índice de selectividad, por lo que fue el compuesto elegido para profundizar en su efecto sobre el parásito. Este trabajo reveló que Pt-dppf-mpo induce necrosis en los parásitos de manera dependiente de la mitocondria. Mientras el potencial de la membrana mitocondrial colapsó después de 24 horas de tratamiento, la actividad esterasa aumentó inesperadamente, presumiblemente como resultado de la activación de una o varias vías en respuesta a la incubación con el compuesto. Por su parte, el análisis de los cambios transcriptómicos promovidos en el parásito permitió identificar procesos relacionados con la desintoxicación, transporte, proteínas de unión a ARN, quinasas, fosfatasa y oxido-reductasas luego del tratamiento con el compuesto en estudio. Los genes modificados son indicadores de los procesos disparados en el parásito y su posible implicancia en la muerte celular inducida se discute en este trabajo.



Durante el desarrollo del presente trabajo se realizaron las siguientes publicaciones:

***Trypanosoma cruzi* biochemical changes and cell death induced by an organometallic platinum compound.** M. Florencia Mosquillo, Lucía Bilbao, Fabricio Hernández, Ignacio Machado, Florencia Tissot, Dinorah Gambino, Beatriz Garat, Leticia Pérez-Díaz. Manuscrito en preparación.

**Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells.** Gonzalo Scalese, M. Florencia Mosquillo, Santiago Rostán, Jorge Castiglioni, Irina Alho, Leticia Pérez, Isabel Correia, Fernanda Marques, João Costa Pessoa, Dinorah Gambino. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 175:154-166, 2017.

**Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases.** Rodríguez Arce, E.; Mosquillo, M. F.; Pérez-Díaz, L; Etcheverria, G.; Piro, O. E.; Merlino, A.; Coitiño, E. A.; Maríngolo Ribeiro, C.; Leite, C. Q. F.; Pavan, F. R.; Otero, L.; Gambino, D. *Dalton Transactions*, v.: 44 32, p.: 14453 - 14464, 2015.

# 1. Introducción y antecedentes

---

## 1.1 Introducción

### 1.1.1 Características de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una zoonosis descubierta por el doctor brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en 1909 (Chagas, 1909). Es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), la cual tiene dos fases clínicas claramente diferenciadas. Una **fase aguda** que suele presentar una duración de 4 a 8 semanas, y una **fase crónica** que persiste durante la vida del afectado (WHO, 2014a). Una vez contraída la infección, dependiendo del sitio de la inoculación, el primer signo puede ser un chancro cutáneo (chagoma) o edema orbital púrpura unilateral (signo de Romaña) con linfadenopatías locales y fiebre. Durante la fase aguda se encuentran parásitos circulantes en sangre y se caracteriza por una sintomatología de intensidad y duración variables, entre las que se destacan dolores de cabeza, mialgias, disnea, edema en las extremidades inferiores o en la cara, dolor abdominal y/o torácico, hepatomegalia, erupción cutánea, nódulos dolorosos, esplenomegalia, edema generalizado, diarrea, múltiples linfadenopatías, miocarditis y más raramente meningoencefalitis. La muerte se produce ocasionalmente en la fase aguda (<5–10% de los casos sintomáticos) como resultado de la miocarditis o meningoencefalitis severa, o ambos, particularmente en niños, ancianos y pacientes inmunodeprimidos. Las manifestaciones de la enfermedad aguda se resuelven espontáneamente en alrededor del 90% de los individuos infectados, incluso si la infección no se trata con fármacos tripanocidas. Entre el 60-70% de estos pacientes nunca desarrollan la enfermedad clínicamente aparente; estos pacientes tienen la forma indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica. El 30-40% restante de los pacientes posteriormente desarrolla una forma determinada de enfermedad crónica, por lo general de 10 a 30 años después de la infección inicial. En un 5–10% de los casos se ha registrado una progresión directa de la fase aguda a una forma clínica de la enfermedad (Rassi Jr, 2010). Durante la fase aguda, todos los tipos de células nucleadas en el huésped humano pueden ser objetivos potenciales para la infección. Con el desarrollo de la respuesta inmune, la parasitemia se reduce a bajas concentraciones y el número de parásitos en los tejidos disminuye sustancialmente, lo que indica el final de la fase aguda. Sin embargo, ya que el parásito no se elimina completamente, la infección de tejidos específicos, tales como el músculo o ganglios entéricos, persiste indefinidamente para la vida del huésped (Rassi Jr, 2010). Precisamente, durante la fase crónica,

los parásitos permanecen principalmente en células del músculo cardíaco y tracto digestivo y hay pocos parásitos en sangre. Alrededor de un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y cerca de un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, megaesófago y megacolon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco (WHO, 2014a).

### 1.1.2 Epidemiología y estado actual del tratamiento

Datos de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO) estiman que alrededor de 8 millones de personas en el mundo están afectadas por esta enfermedad potencialmente letal, con prevalencia en las regiones más pobres de América Latina, donde la enfermedad es endémica en 21 países (WHO, 2016). De este gran número de personas afectadas, hay en promedio 10000 muertes anuales por complicaciones en las fases aguda y crónica de la enfermedad. Se estima además, que casi 100 millones de personas en las Américas viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer la enfermedad y la incidencia anual es de 200000 nuevos casos (PAHO, 2016).



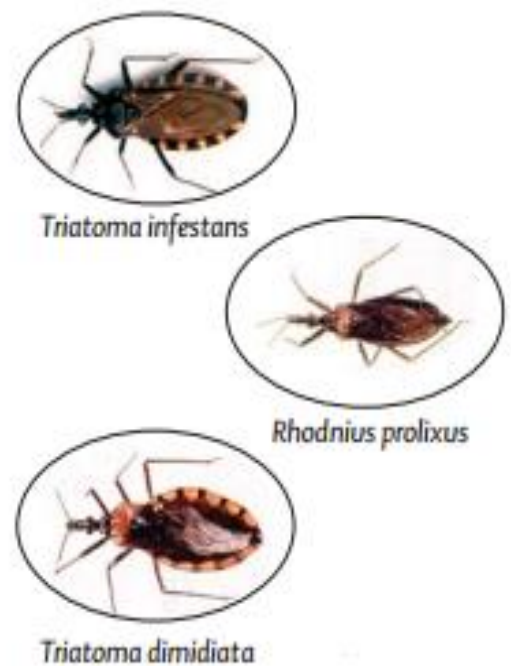
**Figura 1.** Distribución mundial de casos de infección con *Trypanosoma cruzi*. Se muestran los 21 países endémicos de Latinoamérica y el resto de los países donde la enfermedad de Chagas se disemina debido a las altas tasas migratorias hacia zonas no endémicas. Adaptado de [beatchagas.org](http://beatchagas.org).

La infección, que en principio se limitaba a zonas rurales y marginales de Latinoamérica, no sólo pasó a ser urbana, sino que ya no está limitada a las zonas donde la transmisión es

endémica. Debido a las altas tasas migratorias desde estas zonas hacia zonas no endémicas, el número de casos está aumentando en Europa, Estados Unidos y el oeste del Pacífico, planteando un problema de salud pública, incluso en países donde no hay transmisión vectorial del parásito (Figura 1). Este incremento se debe mayoritariamente a los riesgos adicionales de transmisión de la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos (Bern, 2011; Cantey, 2012).

Con el objetivo de disminuir la transmisión vectorial y transfusional, en el año 1991, la Organización Mundial de la Salud lideró un plan para eliminar el vector de la enfermedad de Chagas en áreas endémicas. Estas acciones de control permitieron que Uruguay se encuentre actualmente en un estado avanzado de control vectorial, con interrupción de la transmisión, certificada desde 1997 (OPS, 2004).

La enfermedad de Chagas es transmitida a seres humanos y más de 150 especies de animales domésticos y mamíferos silvestres por medio de insectos hematófagos de la subfamilia **Triatominae** conocidos como “vinchucas”, que funcionan como vectores (De Souza, 2002). Aunque se han identificado 140 especies de triatominos (Schofield, 2009), sólo unos pocos son vectores competentes para *T. cruzi*; particularmente *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* son los vectores más importantes en la transmisión de *T. cruzi* al hombre (WHO, 2002) (Figura 2). Cada región posee un vector principal de la enfermedad: en el Cono Sur es *Triatoma infestans*, en Centroamérica *Rhodnius prolixus*, mientras que *Triatoma dimidiata* se encuentra diseminado desde el centro de México hasta Panamá, registrándose también focos en partes de Colombia, Venezuela, Ecuador y el norte de Perú (Cerecetto, 2012).

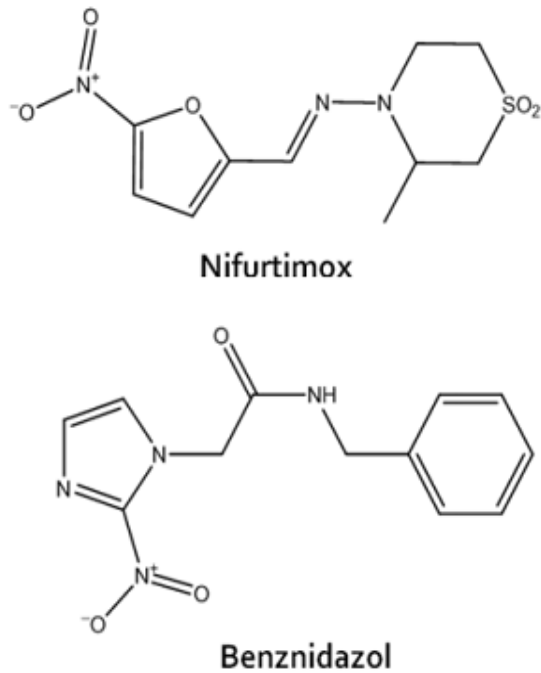


**Figura 2.** Principales especies de triatomíneos vectores en la transmisión de *T. cruzi* al hombre. Extraído de (Rassi Jr, 2010).

A causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a este parásito, no resulta fácil la erradicación total de la enfermedad. Las principales políticas de control consisten

en eliminar la transmisión vectorial y lograr que la población infectada y enferma tenga acceso a la asistencia sanitaria. Dependiendo de la región, las herramientas principales para prevenir la enfermedad en América Latina son el control de vectores mediante fumigación con insecticidas, mejoramiento de la vivienda (por ejemplo, paredes de yeso, pisos de cemento, techos de hierro corrugado) y medidas preventivas personales, como el uso de mosquiteros. La transmisión con el vector se da principalmente por contacto con las heces infectadas de estos insectos con mucosas o una lesión. El insecto vector se alimenta con sangre del hospedero dejando una herida en la piel y defecando cerca de la herida. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona se frota instintivamente y empuja las heces contaminadas con parásitos hacia los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta. Además de este mecanismo natural de transmisión, la infección puede ser congénita (de madre a hijo durante el embarazo o el parto), por transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión accidental en laboratorios, e incluso por transmisión oral por contaminación de la ingesta con heces del vector (Alarcon de Noya, 2010; Otero, 2012; Shikanai-Yasuda, 2012). El cribado de la sangre donada es fundamental para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y donación de órganos. En cuanto a la transmisión congénita la prevención se da mediante un diagnóstico de las mujeres embarazadas infectadas y la detección de la posible infección del recién nacido en los análisis parasitológicos y serológicos después de ocho meses de edad (con ausencia de anticuerpos de la madre). En laboratorios pueden prevenirse accidentes a través de protocolos estándar de seguridad, especialmente cuando se trata de la forma infectiva en humanos del parásito. Por su parte, puede prevenirse la transmisión oral mediante buenas prácticas de higiene en la preparación de alimentos, el transporte, almacenamiento y consumo.

La enfermedad de Chagas ha sido clasificada como una de las 17 enfermedades tropicales “descuidadas” (*neglected tropical disease*) (WHO, 2014b), caracterizada por su asociación con la pobreza y su proliferación en ambientes tropicales, además de la falta de una vacuna disponible y una farmacoterapia adecuada. Es así que a más de 100 años del descubrimiento de la enfermedad, los tratamientos disponibles aún se basan en dos fármacos nitroaromáticos de amplio espectro: **Nifurtimox** y **Benznidazol** (Figura 3).



**Figura 3.** Estructura química de los dos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Nifurtimox (Nfx) es un 5-nitrofurano (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenamina)tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Lampit<sup>®</sup>, Bayer), mientras que Benznidazol (Bz) es un 2-nitroimidazol (N-bencil-2-nitroimidazolacetamida) (Rochagan<sup>®</sup>, Radanil<sup>®</sup>, Roche) (Rodriguez Coura, 2002). Estos medicamentos fueron usados por más de tres décadas sin conocimiento de su mecanismo de acción y fue sólo hace unos años que se conoció que ambos medicamentos, actúan como profármacos, ya que para tener su efecto tripanocida deben ser activados por enzimas nitrorreductasas (NTR) tipo I dependientes de NADPH/NADH como la NTR I (Hall, 2011; Hall, 2012; Hall, 2010; Mejia-Jaramillo, 2011; Wilkinson, 2008; Wilkinson, 2009). Esta enzima, mediante dos reducciones de electrones, transforma el Nfx en cadena abierta de nitrilo, la cual puede

reaccionar con una amplio número de componentes celulares y ser tóxico para el parásito (Hall, 2011). Por otro lado, NTR I metaboliza el Bz y lo reduce a un compuesto tóxico llamado glioxal, el cual forma aductos con la guanosina e impide la formación de nuevas cadenas de ADN (Greig, 2009; Greig, 2006; Hall, 2012). Asimismo, se ha observado que el Bz induce quiebre de ADN de doble cadena en parásitos tratados, posiblemente ocasionado por la oxidación de nucleótidos causando la muerte del parásito (Goijman, 1985; Rajao, 2014). Adicionalmente, se ha visto que el Bz induce arresto del ciclo celular principalmente en G0/G1, con disminución de la actividad metabólica en células de mamífero (Calvo, 2013; Pascutti, 2009). Por otro lado, se ha propuesto que el Bz también actúa mediante la inducción de estrés oxidativo en el parásito, ocasionado por especies reactivas del oxígeno (ROS) (Pedrosa, 2001). *T. cruzi* no tiene actividad catalasa y su actividad superóxido dismutasa es muy baja (Turrens, 2004; Wilkinson, 2003), por lo tanto, su principal defensa contra radicales libres, son el glutatión reducido y un conjugado de glutatión y espermidina llamado tripanotion (Ariyanayagam, 2001; Fairlamb, 1985). Sin embargo, éstos son secuestrados por los metabolitos electrofílicos reducidos del Bz, disminuyendo así la defensa del parásito contra radicales libres, lo cual parece ser la causa del

estrés oxidativo inducido por el Bz en *T. cruzi* (Maya, 1997). Estudios recientes han demostrado que al tratar los parásitos con Bz, se incrementa la producción de 8-oxoguanina (8-oxoG), un indicador de estrés oxidativo, así como la sensibilidad reportada al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), un producto del estrés oxidativo (Aguiar, 2013; Rajao, 2014), afectando además la actividad mitocondrial (Salomao, 2013; Yamanaka, 2013). Aunque este parásito cuenta, con 5 peroxidasas, de las cuales una es la triparredoxin peroxidasa citosólica (TcCPX) y otra mitocondrial (TcMPX), dos peroxidasas dependientes de glutatión (TcGPX I y II) y una hemoperoxidasa dependiente de ascorbato (TcAPX) (Piacenza, 2008; Wilkinson, 2002a; Wilkinson, 2002b; Wilkinson, 2002c; Wilkinson, 2000), este sigue siendo un sistema de detoxificación deficiente.

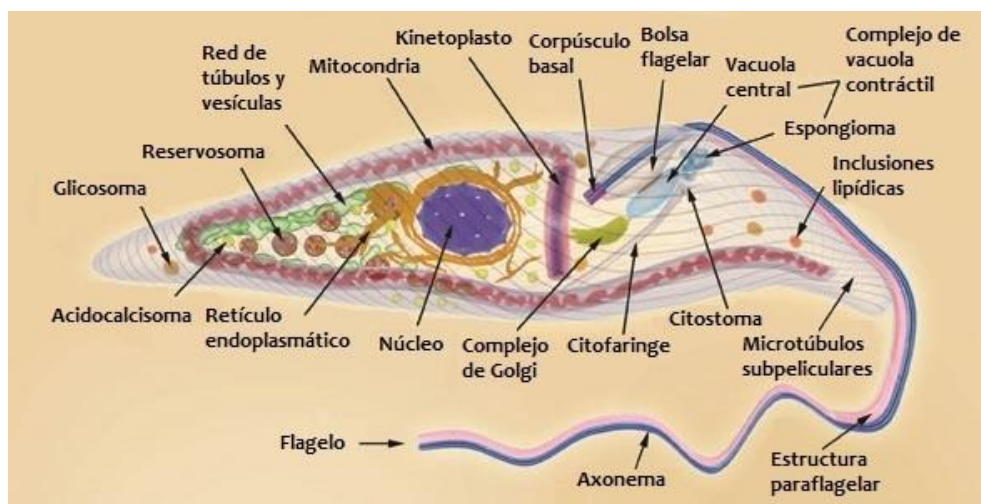
Estos fármacos son básicamente efectivos sólo en los comienzos de la fase aguda, y son considerados menos efectivos en pacientes crónicos por la resistencia desarrollada por parte del parásito (Nozaki, 1996; Wilkinson, 2008). Los beneficios potenciales de la medicación para prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad de Chagas deben sopesarse frente a la larga duración del tratamiento (hasta dos meses) y las reacciones adversas reportadas debido a su alta toxicidad (incidencia de hasta un 40% en los pacientes tratados). Entre los severos efectos secundarios asociados con Bz y Nfx se destacan para Nfx la anorexia, pérdida de peso, alteraciones psíquicas, manifestaciones digestivas, entre otras. Las reacciones adversas del Bz involucran granulocitosis, dolor de garganta, ampollas hemorrágicas y hemorragias de las mucosas (Rodrigues Coura, 2002). Es por ello que tanto Bz como Nfx no pueden ser administrados a mujeres embarazadas o personas con insuficiencia renal o hepática. El Nfx también está contraindicado en personas con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos (WHO, 2014a). Además, se puede requerir un tratamiento específico para las manifestaciones cardíacas o digestivas.

### 1.1.3 Generalidades de *T. cruzi*

El agente etiológico de esta enfermedad, *T. cruzi*, pertenece a la Clase *Zoomastigophora*, Orden *Kinetoplastidiae*, Familia *Trypanosomatidae*, Género *Trypanosoma*, Subgénero *Schizotrypanuma*. El taxón *T. cruzi* constituye una población muy heterogénea que consiste en un gran número de cepas con diferentes características relacionadas con la forma del estadio tripomastigota, perfil antigénico, virulencia, tasa de crecimiento, metaciclologénesis, patogenicidad, tropismo y sensibilidad a fármacos antichagásicos (Buscaglia, 2003). La gran diversidad genética observada entre las diferentes cepas permitió en un inicio agrupar a las

poblaciones en dos grandes grupos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. *T. cruzi* I asociado con el ciclo de transmisión selváticos e infección de los marsupiales. *T. cruzi* II consistía en cinco subgrupos relacionados, denominados IIa–e, asociado con el ciclo de transmisión interno y la infección de los mamíferos placentarios (El-Sayed, 2005a). Actualmente, existe un consenso internacional que reconoce la existencia de seis linajes genéticos principales distribuidas en Unidades de Tipificación Discretas (DTUs) de I-VI (Teixeira, 2012; Zingales, 2009).

*T. cruzi* es un organismo unicelular que presenta al menos cuatro estadios bien diferenciados: amastigotas, tripomastigotas sanguíneos, epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos (Ver 1.1.4 Ciclo de vida de *T. cruzi*). El **núcleo** presenta una organización estructural semejante al de las células eucariotas típicas, midiendo cerca de 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y conteniendo un nucleolo centralizado en epimastigotas (Schenkman, 2011) (Figura 4). En amastigotas y epimastigotas tiene forma redondeada; en tripomastigotas metacíclicos aparece como un organelo elongado con alto contenido de heterocromatina y carente de nucleolo. Presenta una membrana nuclear típica provista de poros y la cromatina condensada dispersa a lo largo del nucleoplasma (Elias, 2001). Los cromosomas son difíciles de distinguir ya que durante el ciclo celular la cromatina no se condensa (De Souza, 1974).



**Figura 4.** Vista esquemática de la forma epimastigota de *T. cruzi*. Se señalan las principales estructuras celulares. Adaptado de (Teixeira, 2014).

*T. cruzi* presenta una **mitocondria** única que se extiende a lo largo del cuerpo celular (Figura 4). 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. Está formado por dos tipos de ADN circular, los maxi y mini círculos, concatenados entre sí, que se concentran cercanos al cuerpo basal. Existen 5000 minicírculos de aproximadamente 1 kb, y 25 maxicírculos cuyo tamaño ronda los 23 kb (Hoffmann, 2016; Shapiro, 1995). Los minicírculos contienen las secuencias que codifican para los ARN guías necesarios para la modificación de los transcritos mitocondriales (adición de uridinas) en un proceso conocido como edición o “editing” (Aphasizhev, 2014; Read, 2016). Los maxicírculos contienen los genes que codifican para un pequeño número de proteínas tales como las subunidades de la citocromo oxidasa, NADH deshidrogenasa y la subunidad 6 de F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPasa (Ruvalcaba-Trejo, 2011).

El **flagelo** emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar y es responsable de la movilidad principalmente en las formas epimastigota y tripomastigota (Figura 4). También puede observarse en amastigotas, pero presenta un tamaño muy corto. El flagelo muestra una estructura típica de nueve pares de dobles de microtúbulos periféricos y un par central.

Otra característica distintiva de los tripanosomátidos es la compartimentalización de la glicólisis en organelos llamados **glicosomas** (Hannaert, 2003; Hannaert, 1994; Michels, 2000; Moyersoén, 2004; Opperdoes, 1977; Opperdoes, 1987; 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, 2000).

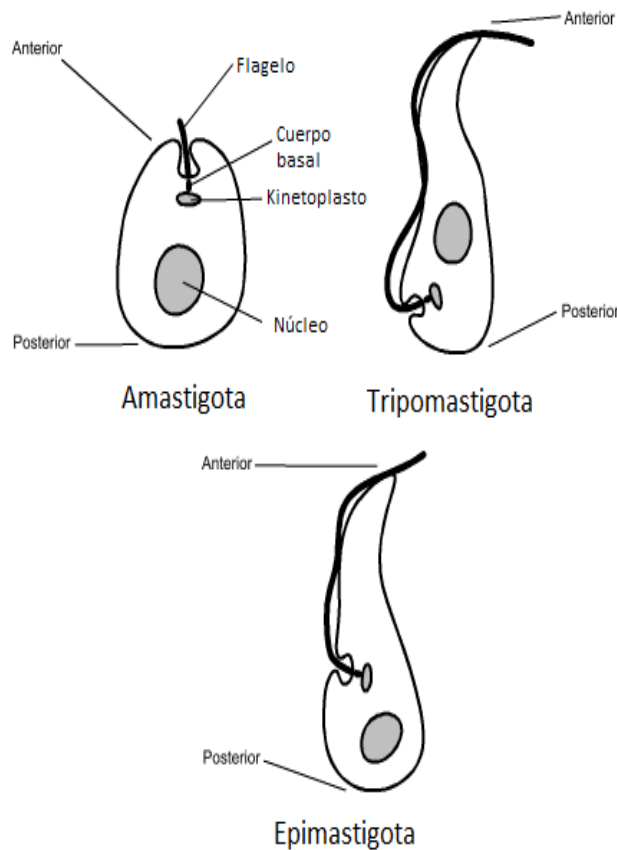
Los **acidocalcisomas** son organelos capaces de transportar protones y calcio y han sido identificados en todos los miembros de la familia Tripanosidae y muchos miembros del phylum Apicomplexa (Docampo, 2005). Los acidocalcisomas están involucrados en varias funciones incluyendo almacenamiento de calcio, magnesio, sodio, potasio, zinc, hierro, pirofosfato inorgánico, así como en la homeostasis del pH y la osmorregulación, participando en estrecha asociación con la vacuola contráctil. La **vacuola contráctil** es una estructura formada por varios túbulos conectados a una vacuola central localizada cerca del bolsillo flagelar. Estudios de estrés osmótico en *T. cruzi* demostraron que contribuye a la regulación del volumen celular bajo estrés hiposmótico (Rohloff, 2008). Por otro lado ha sido demostrado que la vacuola contráctil alberga un transportador de poliamina que puede ser traslocado a la membrana plasmática cuando el medio de incubación es deficiente en poliaminas (Hasne, 2010).

Finalmente, los **reservosomas** son estructuras inusuales donde, después de la endocitosis, son dirigidas las macromoléculas endocitadas, y colocalizan con la mayor cisteín-proteinasa de *T. cruzi*, la cruzipaína (Batista, 2015).

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

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, con diferentes etapas de desarrollo en el insecto vector y en el hospedero mamífero. Entre estos estadios se encuentran formas de vida replicativas y no replicativas, así como formas infectivas y no infectivas. En el hospedero mamífero se encuentran las formas amastigotas y tripomastigotas sanguíneos, mientras que las formas tripomastigota metacíclico y epimastigota se desarrollan en el insecto vector. Los tripomastigotas son infectivos, no replicativos, mientras que los epimastigotas son formas no infectivas, replicativas. Por su parte, los amastigotas, son un estadio intracelular replicativo, cuya infectividad ha sido eje de discusión, sin embargo un estudio realizado con amastigotas obtenidos de diferentes fuentes ha mostrado que también pueden ser infectivos para las células de vertebrados (De Carvalho, 1986).

Durante el proceso de transición de una etapa del ciclo de vida a otra el parásito exhibe cambios profundos en morfología (tamaño celular, forma celular, posición de núcleo y kinetoplasto, y longitud del flagelo) y metabolismo (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema de los estadios del parásito. La morfología de los tripomastigotas sanguíneos y de los metacíclicos es muy similar. Puede distinguirse la ubicación del núcleo, kinetoplasto, cuerpo basal y flagelo.

formas celulares expresan en su superficie múltiples miembros de una gran familia de moléculas, las más caracterizadas son las mucinas y las trans-sialidasas, asociadas a protección y evasión del sistema inmune del hospedero (De Pablos, 2012; Frasch, 2000). Si bien los tripomastigotas metacíclicos y los sanguíneos son casi indistinguibles morfológicamente, existen diferencias a nivel de su biología molecular que permiten su identificación, así como de la expresión de proteínas de superficie (Minning, 2009).

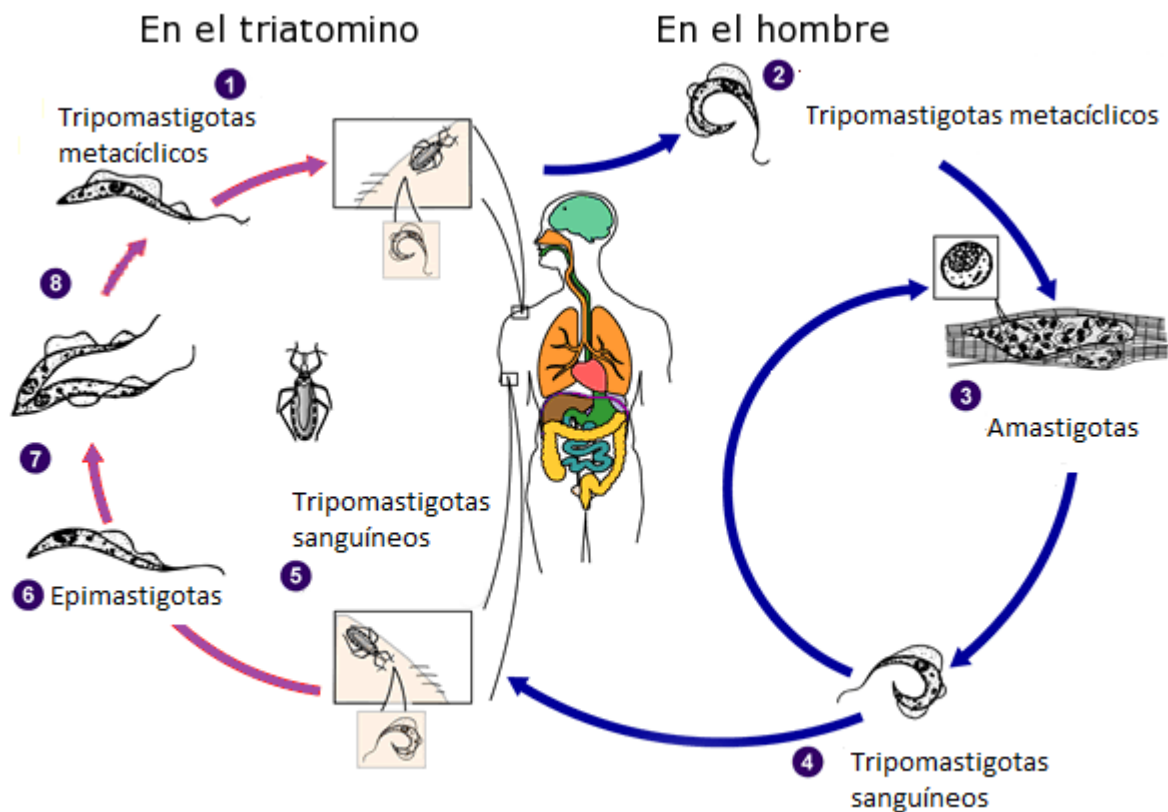
Los **epimastigotas** tienen un flagelo anclado cerca del centro del cuerpo del parásito. El kinetoplasto se ubica anterior al núcleo y tiene forma de disco. En principio miden de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo, pero crecen otros 10  $\mu\text{m}$  a medida que viajan por el intestino del insecto donde se transforman en tripomastigotas metacíclicos.

Los **tripomastigotas metacíclicos** tienen el núcleo cercano a la parte posterior de su cuerpo. Tienen además, un flagelo libre anclado a una membrana ondulante en el cuerpo y el kinetoplasto tiene una ubicación posterior al núcleo. Estos tripomastigotas tienen un tamaño aproximado de 20  $\mu\text{m}$  de largo y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Los **amastigotas** son intracelulares, de forma oval o redondeada, no tienen flagelo protuberante y el kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo. Pueden alcanzar un tamaño de entre 1,5 y 5  $\mu\text{m}$  de largo.

Los **tripomastigotas sanguíneos** están expuestos a las moléculas efectoras del sistema inmune del huésped, incluyendo anticuerpos específicos. Estas

El ciclo de vida comienza cuando los **tripomastigotas metacíclicos** desarrollados en la ampolla rectal del insecto triatomino y contenidos en las heces del vector, inician la infección en vertebrados. Una vez dentro del hospedero son ingeridos por macrófagos e internalizados en la célula mediante vacuolas endocíticas conocidas como vacuolas parasitóforas. Luego de la acidificación del medio, y a medida que los tripomastigotas se van diferenciando a amastigotas, el parásito comienza a secretar la proteína lítica TcTox que en conjunto con la actividad trans-sialidasa lleva a la ruptura gradual de la vacuola parasitófora y a la liberación de los parásitos en el citoplasma. Una vez libres, los parásitos disminuyen su tamaño, entre otros cambios morfológicos, culminando en la formación de **amastigotas** replicativos que proliferan en el citoplasma de la célula infectada por 4 a 5 días hasta que ocupan la mayor parte del volumen citoplasmático. Luego de replicarse por fisión binaria, los amastigotas se diferencian en **tripomastigotas sanguíneos** flagelados que finalmente se liberan al torrente sanguíneo luego de romper la célula hospedera. Desde allí, los tripomastigotas sanguíneos pueden invadir otras células dada su alta capacidad infectiva. Alternativamente pueden ser ingeridos por un insecto vector cuando se alimenta de la sangre del mamífero infectado, convirtiéndose luego dentro del insecto en **epimastigotas**, los cuáles se replican en el intestino medio del insecto, y en última instancia, en la ampolla rectal, se convierten en la forma infectiva tripomastigota metacíclico para cerrar el ciclo de vida (Figura 6).



**Figura 6.** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Un insecto triatomino infectado ingiere sangre y libera tripomastigotas en sus heces cerca del sitio de la herida. Los tripomastigotas entran a través de la herida o a través de membranas mucosas intactas, como la conjuntiva (1). Una vez dentro del hospedero, los tripomastigotas invaden las células cerca del sitio de la inoculación, donde se diferencian en amastigotas intracelulares (2). Los amastigotas se multiplican por fisión binaria (3) y se diferencian en tripomastigotas, que luego de romper la célula se liberan en el torrente sanguíneo (4). Los tripomastigotas infectan las células de una variedad de tejidos y se transforman en amastigotas intracelulares en nuevos sitios de infección. Las manifestaciones clínicas pueden resultar en esta etapa del ciclo infeccioso (d). Los tripomastigotas sanguíneos no se replican. La replicación se reanuda sólo cuando los parásitos son internalizados por otra célula, o cuando son ingeridos por otro vector diferenciándose en epimastigotas cuando el insecto se alimenta de sangre humana o animal que contiene parásitos circulantes (5). Los tripomastigotas ingeridos se transforman en epimastigotas en el intestino del vector (6). Los parásitos se multiplican y se diferencian en el intestino medio (7) y se diferencian en tripomastigotas metacíclicos infecciosos en el intestino posterior (8). Adaptado de (CDC, 2014).

### 1.1.5 Organización genómica de *T. cruzi*

El genoma de referencia de *T. cruzi* es el de la cepa **CL Brener** (DTU TcVI), el cual es un genoma híbrido que comprende dos haplotipos divergentes, Esmeraldo-like (TcII) y non-Esmeraldo-like (TcIII). La secuenciación del genoma publicada en 2005 por el grupo de El-Sayed, reveló que el genoma haploide de la cepa CL Brener contiene 55 Mb distribuidas en aproximadamente 28 cromosomas; el número exacto se desconoce y los homólogos pueden diferir sustancialmente en tamaño. Se estima que el genoma haploide contiene 12000 genes que

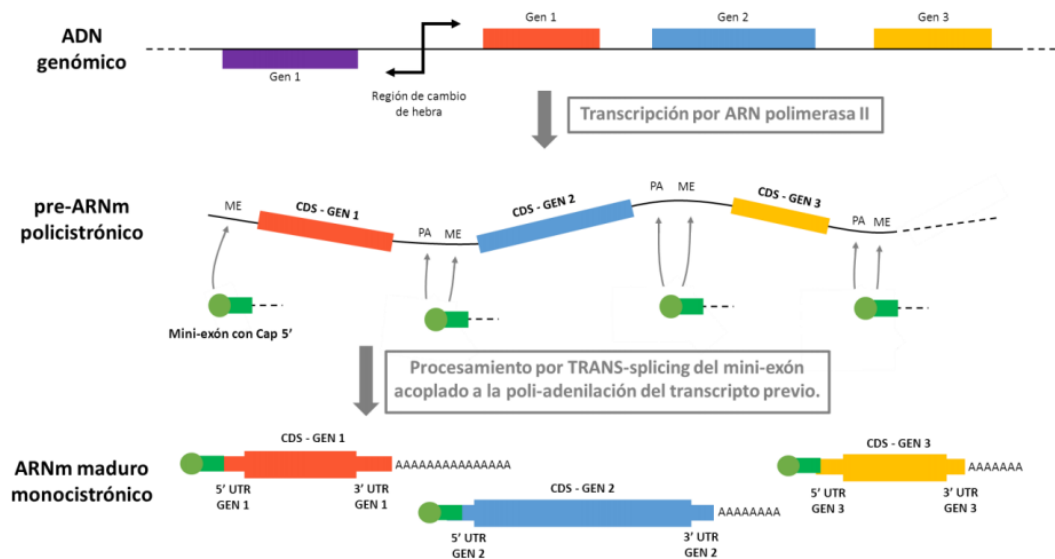
codifican para proteínas, 1994 genes para ARN y 3590 pseudogenes (El-Sayed, 2005a). La secuenciación de este genoma ha permitido identificar más de un 50% de secuencias repetidas como ser retrotransposones y familias multigénicas de proteínas de superficie, que incluyen transsialidasas, mucinas, metaloproteasas y proteínas MASP. Se evidenció un promedio de 57% de identidad aminoacídica entre *T. cruzi* y *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), y un 44% de identidad entre *Leishmania major* (*L. major*) y los otros dos tripanosomátidos. Los análisis proteómicos permiten identificar miembros específicos de cada especie, presentando *T. cruzi* (32%) y *T. brucei* (26%) una proporción mucho mayor que la de *L. major* (12%). Debido a que la mayoría de las proteínas específicas de las especies parecen ser miembros de las familias de antígenos de superficie, los diferentes números pueden relacionarse con diferentes estrategias de supervivencia y evasión inmune utilizadas en cada organismo. Por su parte, de 1617 dominios proteicos identificados en el genoma de los TriTryp, menos de un 5% es exclusivo de una sola especie (El-Sayed, 2005a; El-Sayed, 2005b).

Una particularidad de estos patógenos es que parecen no presentar regulación canónica de la expresión génica a nivel transcripcional. Esto es consecuencia de la inusual organización del genoma: los genes que codifican para proteínas se disponen en *tándem* en grupos direccionales con polaridad de hebra (*Directional Gene Clusters* o DGC) y se transcriben como largos policistrones de 10–100 genes, los cuales, a diferencia de los operones bacterianos, en su mayoría no están relacionados funcionalmente entre sí (Kramer, 2012). Los DGC se encuentran separados por secuencias cortas de unas pocas kilobases llamadas regiones de cambio de hebra (*Strand-Switch Regions* o SSR), donde el sentido de la transcripción diverge o converge (Macias, 2016). Los sitios de cambio de hebra divergente se consideran sitios de inicio de la transcripción y los sitios de cambio de hebra convergente se consideran sitios de terminación de la transcripción (Siegel, 2009).

Otra característica distintiva de los tripanosomátidos es la **ausencia de intrones**. Sin embargo existen dos excepciones documentadas, por un lado el gen de la poliA polimerasa (PAP) (Mair, 2000) y por otro, el gen que codifica para el ARN de transferencia de la tirosina (ARNt-Tyr) (Tan, 2002). Además, estudios de RNA-Seq en *T. brucei* permitieron la confirmación experimental de un intrón presente en la helicasa (Siegel, 2010).

### 1.1.6 Transcripción y maduración de ARNm

En los tripanosomátidos, los ARNs policistrónicos son procesados por mecanismos intermoleculares de *trans*-splicing y poliadenilación para dar lugar a los ARNs mensajeros individuales, como se esquematiza en la Figura 7. El ***trans*-splicing** es un proceso mediante el cual se agrega a los ARN mensajeros transcritos primarios una secuencia de ARN ("*spliced leader*" o "SL" o "miniexón") de 39 nucleótidos al extremo 5', en una posición ubicada unos nucleótidos antes del sitio de inicio de un marco abierto de lectura (Pays, 1994). La secuencia del miniexón proviene del extremo 5' de un ARN nuclear pequeño (snRNA), el ARN SL, que está compuesto por 120 nucleótidos y no está poliadenilado (Agabian, 1990). La adición del miniexón se produce en un sitio consenso constituido por un dinucleótido AG localizado corriente arriba del codón de iniciación a distancias variables (Agabian, 1990), y generalmente está precedido por un tracto de polipirimidinas. Este fenómeno ocurre co-transcripcionalmente (Ullu, 1993) y es fundamental para la traducción correcta de los mensajeros (Figura 7).



**Figura 7.** Expresión génica en tripanosomátidos. Se esquematizan las etapas de transcripción y procesamiento de los transcritos primarios. El ARN del mini-exón también es transcrito por la ARN polimerasa II a partir de otra región genómica (Chávez García, 2016).

Previo al proceso de *trans*-splicing, el miniexón adquiere en su extremo 5' una estructura CAP necesaria para el procesamiento del miniexón (Ullu, 1991). Se sugiere que una función de la secuencia del miniexón o "*spliced leader*" es la de proveer la estructura CAP a los ARNm (Lenardo, 1985). En tripanosomátidos esta estructura, denominada CAP 4, consiste en una 7-metilguanosa y los cuatro primeros nucleótidos modificados por adición de grupos 2'O-metilo (Bangs, 1992).

El proceso de **poliadenilación** en *T. cruzi* es similar al resto de los eucariotas superiores. En el mismo participa una endonucleasa de restricción específica que corta el pre-mensajero en su extremo 3' y la enzima poliA polimerasa que incorpora adenosinas a expensas de ATP. A diferencia con los eucariotas superiores, para los cuáles se ha descrito una secuencia conservada AAUAAA que actúa como señal de poliadenilación (Wahle, 1992), en tripanosomátidos, no se ha podido describir una secuencia consenso. Sin embargo, se ha demostrado la importancia del trecho de polipirimidinas que interviene en el *trans*-splicing de los genes en el extremo 5' en la poliadenilación del extremo 3' del gen previo (Schurch, 1994).

Los transcritos mitocondriales requieren una maduración que involucra la adición, o menos frecuentemente, la delección de residuos de ribonucleótidos (particularmente uridinas) en un proceso denominado "**editing**" (Shaw et al., 1988). El "**editing**" resulta en cambios de la secuencia codificante del ARNm no dirigidos por el ADN molde sino por ARN guías codificados por los minicírculos.

### 1.1.7 Regulación de la expresión génica

Debido a la organización genómica y a que todos los precursores de ARN policistrónico se transcriben aproximadamente a la misma tasa, se ha propuesto que la regulación de la expresión de genes ocurre básicamente a nivel post-transcripcional (Clayton, 2002; Gomez, 2010; Ouellette, 2009). Además, la ausencia de elementos canónicos conservados como promotores de la ARN polimerasa II (Clayton, 2002; Gomez, 2010; Smircich, 2013) apoya el hecho que la regulación de la expresión génica ocurra básicamente por mecanismos post-transcripcionales. En este contexto se han evidenciado algunas estrategias por parte del parásito para aumentar el nivel de expresión de ciertos genes en tripanosomátidos. Una de ellas consiste en aumentar el número de copias del gen de interés en el genoma resultando en arreglos de repetidos en *tándem* para ciertos genes de alta expresión (Iantorno, 2017).

Las modificaciones de la cromatina también juegan un importante rol, ya que los inicios y finales de la transcripción de las unidades de transcripción policistrónicas están marcados de forma epigenética por variantes de histonas/histonas modificadas post-traduccionalmente (Duhagon, 2001; Respuela, 2008; Siegel, 2009; Thomas, 2009).



Por otro lado, existen factores que actúan en *trans* (principalmente a nivel de proteínas de unión al ARN, RBP) (Clayton, 2013; Perez-Diaz, 2013) e interaccionan con secuencias en *cis*, principalmente localizadas en las regiones no traducidas de los mensajeros (UTR). Se ha demostrado que las RBP establecen interacciones con grupos de ARNs que comparten elementos en *cis*, definiendo grupos co-regulados de mensajeros que podrían cumplir funciones relacionadas (Keene, 2007).

Otro nivel de regulación de la expresión génica es la localización diferencial de los mensajeros en la célula. Ha sido demostrado recientemente que el compartimento nuclear juega un rol en el control de los mecanismos de regulación de la expresión génica en este parásito (Pastro, 2017). Los mensajeros que no son requeridos en el estadio epimastigota no serían procesados eficientemente y a su vez se acumularían en el núcleo como forma de impedir su traducción. A su vez, los mensajeros cuyos productos son altamente requeridos, serían procesados y acumulados en el citoplasma, probablemente debido a un aumento de su vida media, garantizándose así su traducción (Pastro, 2017).

Recientemente, se ha enfatizado en el estudio del rol de la eficiencia traduccional de los mensajeros, como forma de regular la abundancia proteica en los tripanosomátidos (da Silva Augusto, 2015; Smircich, 2015).

### 1.1.8 Mecanismos de muerte celular en *T. cruzi*

La muerte celular puede darse básicamente por tres mecanismos: autofagia, apoptosis y necrosis. La **autofagia** es un mecanismo que involucra el secuestro en vesículas de doble membrana (autofagosomas) de organelos citoplasmáticos y macromoléculas que se encuentran en exceso, superan su tiempo de vida media o son innecesarios en ciertas condiciones celulares. Estos autofagosomas son luego enviados a lisosomas para su degradación, mediante una respuesta no inflamatoria (Alvarez, 2008). La **apoptosis** es un proceso cuidadosamente regulado de muerte celular que se produce como parte normal del desarrollo. La apoptosis se distingue de la necrosis, o muerte celular accidental, por los cambios morfológicos y bioquímicos característicos, incluyendo la compactación y la fragmentación de la cromatina nuclear, el encogimiento del citoplasma, y la pérdida de la asimetría de la membrana. En células vivas normales, la fosfatidilserina (PS) se encuentra en la superficie citoplasmática de la membrana

celular. Sin embargo, en las células apoptóticas, la PS se transloca desde el interior hacia el exterior de la membrana plasmática, exponiéndose así al entorno extracelular, por lo que es usada como un marcador específico de este tipo de muerte celular. En *T. cruzi* la apoptosis se da mediante reguladores no canónicos, dado que no se encuentran presente en estos organismos las caspasas, miembros de la familia Bcl-2, ni receptores de la familia TNF (Smirlis, 2011). Por su parte, la **necrosis** es definida como un proceso de colapso celular, que involucra un incremento del volumen celular (oncosis), que lleva finalmente a la ruptura de la membrana plasmática y al desmantelamiento desorganizado de los organelos. Aparte de la permeabilización de la membrana, la necrosis no presenta marcadores bioquímicos específicos (Sandes, 2014).

### 1.1.9 Compuestos metálicos como potenciales agentes antichagásicos

En la búsqueda de nuevas herramientas terapéuticas contra la enfermedad de Chagas, los complejos metálicos aparecen como un nuevo enfoque prometedor. Una exitosa estrategia se basa en la síntesis de complejos que combinan la actividad de ligandos como agentes anti-tripanosomas y metales farmacológicamente activos, llevando a un efecto sinérgico o por lo menos un efecto aditivo (Sanchez-Delgado, 2004a; Sanchez-Delgado, 2004b). El desarrollo de agentes individuales que proporcionan la máxima actividad antiprotozoaria al actuar contra procesos específicos del parásito, podría disminuir los efectos tóxicos para el huésped mediante la reducción de la dosis terapéutica y/o por evasión del desarrollo de resistencia a los fármacos (Chibale, 2002).

El Grupo Química Inorgánica Medicinal: desarrollo de potenciales fármacos inorgánicos, dirigido por la Dra. Gambino (Facultad de Química, Udelar) se ha dedicado a la síntesis de complejos metálicos con actividad antiparasitaria, con el fin de potenciar su actividad y propiedades biológicas globales. En este sentido, este grupo ha estudiado el efecto de la coordinación de metales en la bioactividad del N-óxido de amina aromática, 1-óxido de piridina-2-tiol (mpo). En particular, se sintetizaron y evaluaron *in vitro* complejos mpo de paladio y platino (M-mpo, donde M = Pd o Pt), y demostraron que el complejo de platino es preferentemente tóxico hacia los parásitos, además de ser menos tóxico para las células normales que el ligando libre y el complejo de paladio análogo (Vieites, 2008). En un reciente proyecto, este grupo ha rediseñado los compuestos mpo incluyendo un derivado de ferroceno en la esfera de coordinación del metal. A pesar de ser organometálicos, los derivados del ferroceno son por lo general estables en aire y

en solución y, además, por lo general muestran una baja citotoxicidad y confieren a las moléculas en las que se incluyen, la lipofilia adecuada para traspasar las membranas celulares (Biot, 2010). Los nuevos compuestos basados en hexafluorofosfato de 1,1'-bis (difenílfosfino) ferroceno piridina-2-tiolato-1-óxido de M(II), de fórmula  $[M(dppf)(mpo)]$ , donde M(II) es paladio  $[Pd-dppf-mpo]$  o platino  $[Pt-dppf-mpo]$  y dppf es 1,1'-bis (difenílfosfino) ferroceno, se sintetizaron y caracterizaron completamente en estado sólido y en solución (Rodríguez Arce, 2015) (Figura 8).

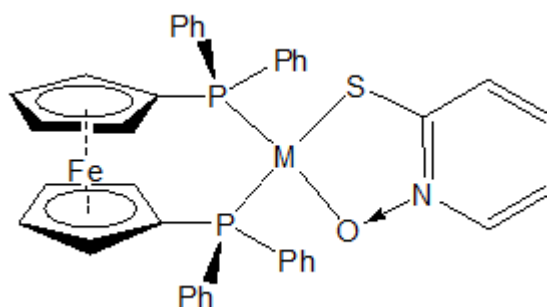
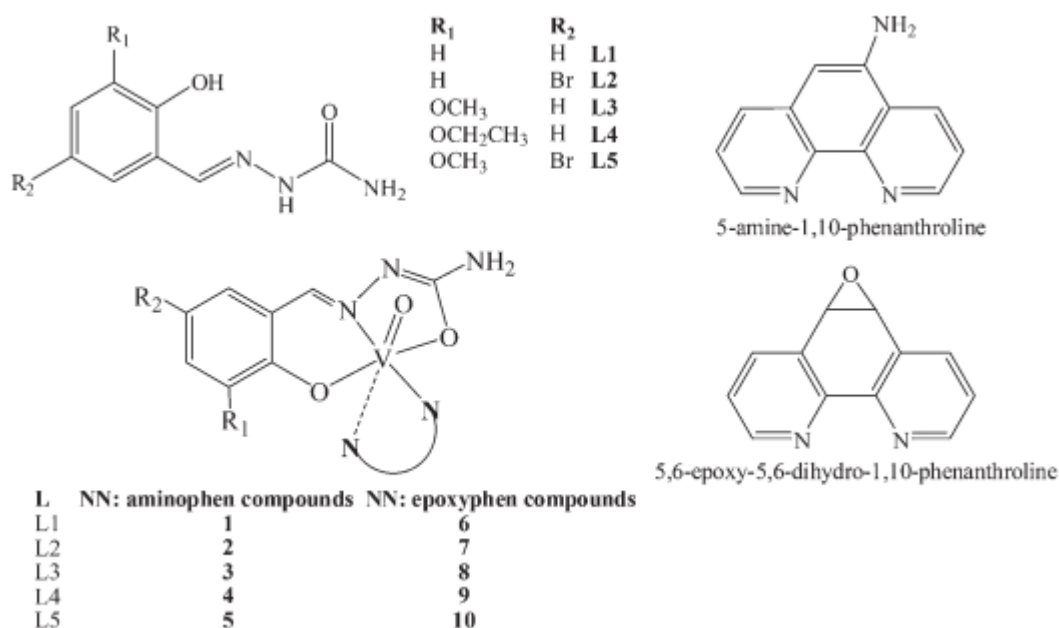


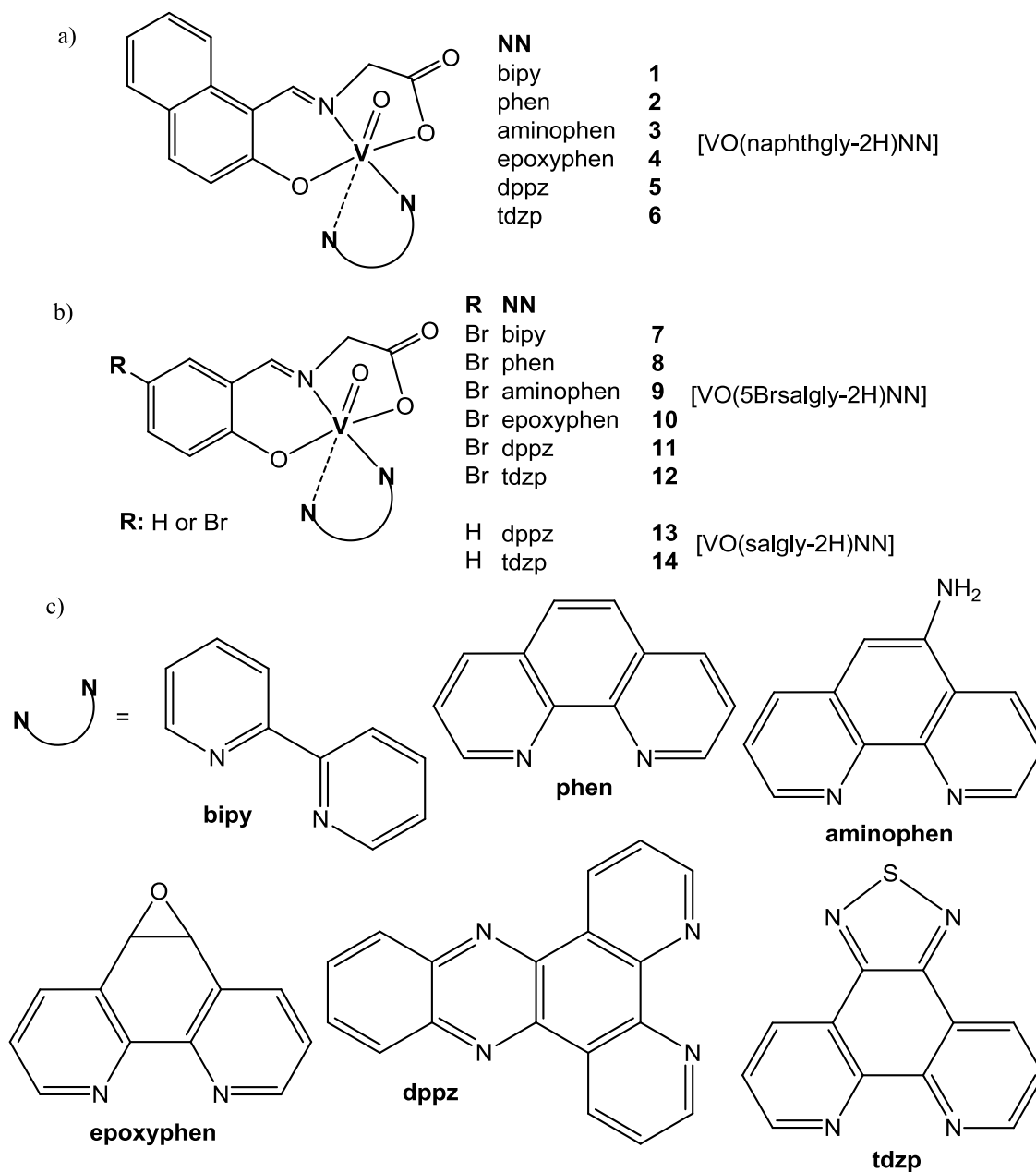
Figura 8. Compuestos  $[M(dppf)(mpo)](PF_6)$

En paralelo, el grupo ha desarrollado diferentes series de potenciales fármacos anti-*Trypanosoma cruzi* basados en vanadio. Una de ellas es una familia de 32 compuestos de oxidovanadio(IV), diseñados para intercalar el ADN, con fórmulas  $[VO(L-2H)(NN)]$ , donde NN corresponde a un ligando polipiridínico bidentado con capacidad intercalante y L corresponde a un coligando tridentado derivado de la salicilaldehído semicarbazona (Figura 9). Los estudios QSAR (estudios cuantitativos de relación estructura-actividad) demostraron la importancia de la lipofilia y de la naturaleza del ligando NN en la actividad biológica observada (Fernández, 2013). Muchos de los compuestos de esta serie mostraron alta selectividad hacia el parásito, con valores de  $IC_{50}$  (concentración inhibitoria de la proliferación del 50% de los parásitos) en el rango submicromolar contra *T. cruzi* y baja citotoxicidad en células mamíferas, siendo el compuesto  $VO(L-2H)(aminophen)$  el líder de esta serie (Figura 9) (Fernández, 2013).



**Figura 9.** Compuestos de oxidovanadio(IV) con ligandos tridentados derivado de la salicilaldehído semicarbazona y co-ligandos derivados de fenantrolina. Extraído de (Fernández, 2013).

Además, el mismo grupo ha desarrollado otra serie de compuestos que incluyen ligandos de salicildaldimina doble desprotonadas, derivados de glicina y salicilaldehído o 5-bromo-salicilaldehído, [VO(salgly-2H)(NN)] y [VO(5Brsalgly-2H)(NN)], y diferentes co-ligandos de NN-polipiridilo (Figura 10). Además se incluyeron compuestos heterolépticos estructuralmente relacionados de oxidovanadio(IV) homolépticos y heterolépticos, [VO(naftil-2H)(NN)], donde nafténido=N-(2-hidroxi-1-naftilideno)-glicinato (Figura 10). La evaluación biológica de esta serie de compuestos se realizó con algunas de las técnicas puestas a punto en el presente trabajo (Scalese, 2017).



**Figura 10.** a) Estructura de los complejos de oxidovanadio(IV) con naphthgly. b) Estructura de los complejos de oxidovanadio(IV) con 5BrSalgly y salgly. c) NN polypyridyl co-ligandos seleccionados: bipy, phen, aminophen, epoxyphen, dppz y tdzp. Extraído de (Scalese, 2017).

## 1.2 Antecedentes

La capacidad antiproliferativa de los compuestos M-dppf-mpo fue evaluada sobre epimastigotas de la cepa Dm28c de *T. cruzi*. El efecto de estos compuestos también fue evaluado y comparado con el fármaco Nifurtimox y con la sal de mpo, Nampo. La actividad para Pd-dppf-mpo y Pt-dppf-mpo, respectivamente se ve incrementada entre 2 y 5 veces, con relación a la observada para este compuesto libre ( $IC_{50} = 1,33 \pm 0,08 \mu M$ ). Además, los compuestos muestran entre 10 y 20 veces mayor actividad con respecto al fármaco de referencia, Nifurtimox ( $IC_{50} = 6,0 \mu M$ ). Ambos compuestos muestran una alta actividad citotóxica contra el parásito, con valores de  $IC_{50}$  en el rango submicromolar. Además, con el fin de conseguir una mayor comprensión de la potencialidad de ambos compuestos metálicos, se evaluaron sus citotoxicidades sobre las células epiteliales VERO *in vitro*, observándose un alto índice de selectividad contra el parásito (Rodríguez Arce, 2015). Todos los resultados de estos nuevos compuestos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Actividad *in vitro* contra *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa Dm28c), citotoxicidad sobre células epiteliales Vero (ATCC CCL81) y valores de índice de selectividad (IS) ( $IC_{50} T. cruzi / IC_{50}$  células Vero). Los experimentos fueron realizados por triplicado (Rodríguez Arce, 2015).

Compuesto	$IC_{50} T. cruzi \pm SD (\mu M)$	$IC_{50} Células Vero \pm SD (\mu M)$	IS
Pd-dppf-mpo	$0,64 \pm 0,03$	$24,5 \pm 12,2$	39
Pt-dppf-mpo	$0,28 \pm 0,01$	$5,1 \pm 3,3$	18

Los nuevos compuestos M-dppf-mpo muestran una actividad anti-*T. cruzi* similar a la de los complejos mpo desarrollados anteriormente, pero con índices de selectividad mayores. En conclusión, aunque los nuevos compuestos de metal mostraron una actividad similar, la inclusión de la fracción de ferroceno disminuye la citotoxicidad en células de mamífero por el aumento de la selectividad contra el parásito (Rodríguez Arce, 2015).

En el caso de los compuestos de oxidovanadio(IV), con fórmulas  $[VO(L-2H)(NN)]$ , para este proyecto se seleccionó el complejo  $[VO(L2-H)aminophen]$ , el cual presenta sobre la cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi* un muy bajo valor de  $IC_{50}$ , de  $0,27 \mu M$ , y una baja citotoxicidad inespecífica, al presentar en macrófagos J-774 un  $IC_{50}$  de  $50 \mu M$ . Estos resultados biológicos lo convierten en el compuesto líder de esta serie debido a su alta especificidad hacia el parásito (valor IS: 185) (Fernández, 2013).

## 2. Hipótesis y objetivos

---

### 2.1 Hipótesis

Los potenciales compuestos antichagásicos promueven cambios celulares y transcriptómicos en epimastigotas de la cepa CL Brener de *T. cruzi*, que pueden permitir identificar genes y vías metabólicas candidatas a ser blancos de acción de estos compuestos.

### 2.2 Objetivo general

Seleccionar un potencial compuesto antichagásico y estudiar su mecanismo de acción mediante los cambios celulares y transcriptómicos promovidos en epimastigotas de la cepa CL Brener de *T. cruzi*, con el fin de identificar genes y vías metabólicas candidatas a ser blancos de acción del compuesto.

### 2.3 Objetivos específicos

- I. Estudiar la actividad *in-vitro* anti-*Trypanosoma cruzi*, incluyendo la determinación del valor de IC<sub>50</sub> sobre la cepa CL Brener y sobre células VERO, ensayos de recuperación y determinación del índice de captura y asociación a macromoléculas.
- II. Realizar la evaluación celular del efecto del compuesto, incluyendo el estudio de los cambios morfológicos, el tipo de muerte celular, el cambio de potencial de membrana mitocondrial y el metabolismo celular.
- III. Analizar el efecto en la transcripción global a través de análisis comparativo del transcriptoma de epimastigotas tratados vs. epimastigotas control mediante RNA-Seq.
- IV. Validar mediante PCR en tiempo real genes modificados seleccionados en respuesta al compuesto.

## 3. Materiales y métodos

---

### 3.1 Soluciones y tampones

PBS 1X: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Anexina V (AV) Alexa Fluor® 488: Solución en 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, 0.1% albúmina bovina sérica (BSA)

Tampón de unión de Anexina V: 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4

Ioduro de propidio (IP): 1 mg/mL (1,5 mM) en agua ultrapura

Tampón de lisis de parásitos: Tris-Cl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, CHAPS 1%, glicerol 10%, tritón 0.5%, inhibidor de proteasas

### 3.2 Medios de cultivo

Medio 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, 10 mL hemina, 990 mL H<sub>2</sub>O. Autoclavar 20 minutos o filtrar por 0.22 μM. Adicionar 1% de penicilina/estreptomicina 100X y 10% de suero fetal bovino (SFB) tratado 15 minutos a 65 °C para la inactivación del complemento.

### 3.3 Cepas

Se cultivaron epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa CL Brener (Zingales, 1997). Los parásitos fueron cultivados a 28 °C en medio BHI suplementado con suero fetal bovino 10% descomplementado. Rutinariamente los cultivos se repicaron cada 72 horas para mantenerlos en fase exponencial de crecimiento.

### 3.4 Determinación del IC<sub>50</sub> sobre *T. cruzi*

Los epimastigotas de la cepa CL Brener fueron crecidos a 28 °C en medio BHI, suplementado con 10% de SFB descomplementado, desde una concentración inicial de trabajo de 1x10<sup>6</sup> parásitos/mL. Se realizó el *stock* de los compuestos metálicos basados en paladio, platino y vanadio en DMSO. A partir de ello se realizaron las diluciones en medio BHI para trabajar en el rango de concentraciones apropiado para cada uno, de manera que la concentración de DMSO en



el medio de cultivo no exceda el 0.4% (v/v) y no tenga efecto sobre la proliferación de los parásitos (no se observa efecto sobre el crecimiento de epimastigotas en presencia de hasta 1% de DMSO en el medio de cultivo (Vieites, 2008). La habilidad de los compuestos de inhibir el crecimiento de los parásitos fue evaluada por triplicado y se comparó con un control sin compuesto en presencia de 0.4% de DMSO. El crecimiento del cultivo se siguió por densidad óptica a 595 nm por 5 días en un espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode. El porcentaje de crecimiento (PC) se calculó de la siguiente manera:

**PC = [ (A<sub>p</sub> - A<sub>0p</sub>) / (A<sub>c</sub> - A<sub>0c</sub>) ] x 100**, donde:

A<sub>p</sub> = A<sub>595</sub> del cultivo conteniendo los compuestos al día 5;

A<sub>0p</sub> = A<sub>595</sub> del justo después de la adición de los compuestos (día 0);

A<sub>c</sub> = A<sub>595</sub> del cultivo en ausencia de los compuestos al día 5;

A<sub>0c</sub> = A<sub>595</sub> del cultivo en ausencia de los compuestos al día 0.

Se realizó la curva correspondiente y se ajustó a la siguiente ecuación (<http://www.graphpad.com/support/>) en el programa GraphPad Prism 5:

**Y = Top + (Bottom-Top) / (1 + ((IC<sub>50</sub>/X) ^ HillSlope))**

Las reglas para los valores iniciales fueron:

Top = 1\*Ymax;

Bottom = 1\*Ymin;

IC<sub>50</sub> = 1\*(Value of X at Ymid);

HillSlope = 1\*sgn (YatXmax-YatXmin)

A partir de esta curva dosis-respuesta se determinó el valor de IC<sub>50</sub> para cada compuesto. Al menos dos experimentos independientes se utilizaron para calcular el IC<sub>50</sub> y cada experimento constó de tres o seis réplicas.

### 3.5 Determinación del IC<sub>50</sub> sobre células VERO

Para estudiar la citotoxicidad sobre células mamíferas y la selectividad del compuesto contra los parásitos, las células VERO fueron seleccionadas como modelo de células de mamífero. Estas células pertenecen a un linaje celular fue aislado a partir de las células epiteliales de riñón de mono verde africano. La viabilidad de estas células luego del tratamiento con cada compuesto fue determinada mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima

mitocondrial succinato-deshidrogenasa formando un compuesto coloreado de color púrpura (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para el ensayo,  $1 \times 10^3$  células/pocillo) fueron plaqueadas en 0,2 mL de medio DMEM en placas de 96 pocillos e incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para favorecer la adhesión. Diferentes concentraciones de cada compuesto fueron añadidas e incubadas por 24 horas. Para el ensayo de MTT, fueron agregados 20 µL de MTT (5 mg/mL en PBS) a cada pocillo. Las placas fueron incubadas por 4 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de la incubación, se removió el medio, se agregó 0,1 mL de DMSO a cada pocillo, y se incubó 15 minutos a TA, con agitación constante en oscuridad. La presencia de células viables fue visualizada por el desarrollo del color púrpura debido a la formación de cristales de formazán. La densidad óptica OD fue medida a 570 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode. La concentración requerida para inhibir la proliferación del 50 % de las células fue determinada usando el programa GraphPad Prism 6. Dos experimentos independientes se utilizaron para calcular el IC<sub>50</sub> y cada experimento constó de tres réplicas.

### 3.6 Recuperación de parásitos

Para determinar la capacidad tripanocida o tripanostática del compuesto se incubaron epimastigotas cultivados a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL, con 1x, 5x y 10x IC<sub>50</sub> de compuesto durante 4 horas, en ensayos por duplicado. Después de la incubación, los parásitos se recolectaron por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos, se lavaron con medio BHI fresco y se transfirieron a un medio BHI nuevo, libre de complejo. El crecimiento relativo se obtuvo determinando la relación entre la densidad celular de cultivos incubados con el compuesto y de cultivos de control siguiendo la absorbancia a 595 nm a las 0, 24, 48 y 72 horas, y relativizando los datos al tiempo inicial. Los datos fueron colectados en un espectrofotómetro Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode. Los parásitos se consideraron muertos si después de transferirlos a un medio libre de compuesto no pudieron reanudar el crecimiento luego de 72 horas.

### 3.7 Índice de captura

Para determinar el porcentaje de incorporación del compuesto por parte de los parásitos, se realizaron incubaciones de  $8 \times 10^7$  parásitos ( $2 \times 10^7$  parásitos/mL), con 1x, 5x y 10x IC<sub>50</sub> y se

recolectaron muestras a distintos tiempos entre las 0 y las 48 horas. Cada muestra se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos para separar el pellet conteniendo a los parásitos del sobrenadante. El *pellet* fue lavado con PBS 1X, centrifugado 1000 g durante 10 minutos y resuspendido en el mismo tampón. Las muestras se analizaron por espectrometría de absorción atómica electrotermica en un espectrofotómetro Thermo iCE 3500 (Thermo Fisher Scientific). El porcentaje de ingreso del compuesto metálico en los parásitos fue determinado como la concentración del metal cuantificada de acuerdo a la siguiente ecuación: % ingreso =  $[P] / [P] + [S]$ . Siendo [P] la concentración de metal en los parásitos en *pellet*, y [P] + [S] la concentración total de metal incorporada al experimento (suma de sobrenadante y *pellet*). Por su parte, los ajustes lineales se realizaron en el programa GraphPad Prism 5.

### 3.8 Asociación a macromoléculas

Para la obtención de macromoléculas se utilizaron  $8 \times 10^7$  parásitos ( $2 \times 10^7$  parásitos/mL) tratados con 5x y 10x  $IC_{50}$  del compuesto seleccionado durante 6 horas. Se aislaron con kits comerciales y protocolos estándar ADN, ARN y proteínas. El ADN fue aislado con DNAzol Reagent (Life Technologies). Brevemente, se añadió 1 mL de DNAzol Reagent a  $3 \times 10^7$  parásitos en pellet para lisarlos. Se centrifugaron y se precipito el ADN por adición de 0,5 mL de etanol 100%. Luego de otra centrifugación el ADN se lavó con 1 mL de etanol 75%. Se removió el etanol y el ADN se solubilizó en agua ultrapura. Para aislar proteínas de  $3 \times 10^7$  parásitos, se añadió 1 mL de Buffer de lisis de parásitos (3.1 Soluciones y tampones). Después de 30 minutos de agitación en hielo, el lisado se centrifugó por 1 hora a 4 °C a 20000 g. Del sobrenadante se aislaron las proteínas solubles, y del *pellet* las insolubles, que fueron resuspendidas en 0,5 mL para su posterior análisis. Para aislar ARN se empleó TRIzol Reagent (Life Technologies), partiendo de  $3 \times 10^7$  parásitos, siguiendo el protocolo que se detalla en la sección 3.13 Extracción de ARN de *T. cruzi*. Para todas las determinaciones analíticas de platino se realizaron duplicados. Las muestras se analizaron por espectrometría de absorción atómica electrotermica en un espectrofotómetro Thermo iCE 3500 (Thermo Fisher Scientific).

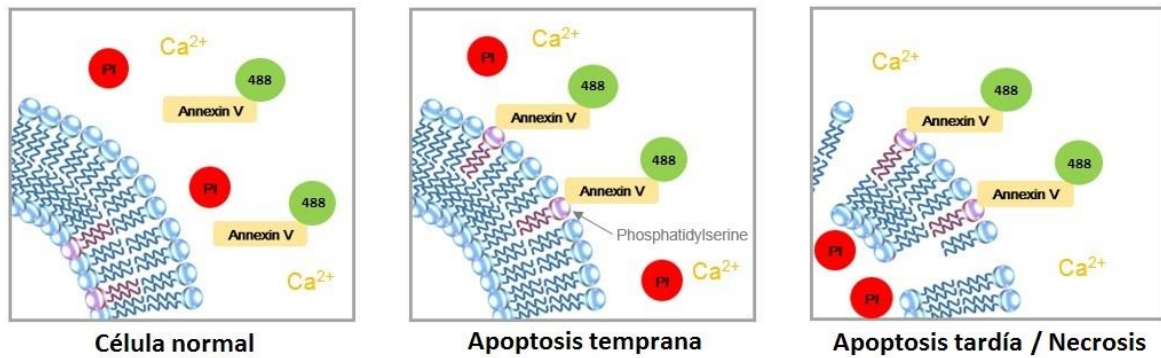
### 3.9 Microscopía de campo claro

Para visualizar cambios en la morfología celular, parásitos tratados y parásitos control sin tratamiento fueron evaluados en cultivo. Para ello, se incubaron los parásitos con 1x, 5x y 10x  $IC_{50}$

de compuesto durante 6 y 24 horas. Los parásitos fueron observados en un microscopio con una cámara Canon PowerShot A95 acoplada. El número de parásitos con morfología normal o alterada con relación al número total de parásitos fue determinado y expresado como porcentaje  $\pm$  SD, tomando imágenes de diversos campos y clasificando al menos 100 células en dos experimentos independientes.

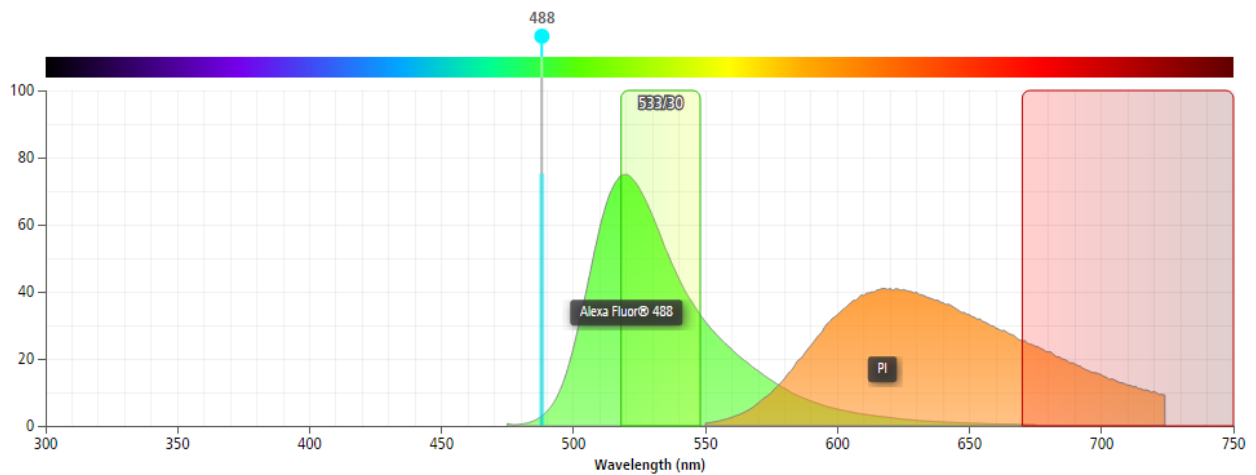
### 3.10 Tinción con Anexina V / Ioduro de propidio

El estudio del mecanismo de muerte ejercido por el compuesto metálico en epimastigotas de *T. cruzi* se realizó mediante el uso de marcadores fluorescentes. La identificación de las células apoptóticas o necróticas se realizó mediante citometría de flujo. El ensayo se basa en el marcaje indirecto de los parásitos PS positivos usando el kit de apoptosis Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell (Invitrogen), un ensayo rápido y conveniente para detectar apoptosis que ya ha sido puesto a punto para epimastigotas de *T. cruzi* (Deolindo, 2005; Irigoin, 2009; Sandes, 2014; Veiga-Santos, 2014). El anticoagulante humano, anexina V, es una proteína de entre 35-36 kDa,  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente, de unión a fosfolípidos y que tiene una alta afinidad por la PS. Por tanto, mediante el uso de la anexina V recombinante conjugada con el fluoróforo Alexa Fluor® 488 (ex/em:  $\sim$ 499/ $\sim$ 520 nm), se pueden identificar células apoptóticas tempranas mediante la unión a PS expuesta al espacio extracelular. El kit incluye una solución de ioduro de propidio (IP) rojo fluorescente que se une a ácidos nucleicos (ex/em  $\sim$ 495/ $\sim$ 635 nm). El uso de IP permite identificar las células necróticas, penetrando únicamente en las células muertas, lo que permite la discriminación de las células vivas (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de los procesos de apoptosis y necrosis y marcadores moleculares que se emplean para su identificación.

Es importante notar que al emplear dos fluorocromos deben realizarse los controles necesarios para evitar la superposición de los espectros de emisión. Para seleccionar fluorocromos compatibles existen herramientas *online*, como *Spectrum viewer* de BD Biosciences, <http://www.bdbiosciences.com/us/s/spectrumviewer>, que permiten seleccionar para determinado citómetro, de acuerdo a los láseres y detectores que posee, si ciertas combinaciones son viables y adecuadas. En este caso, los espectros de emisión de los fluorocromos seleccionados se esquematizan en la Figura 12, donde puede observarse solapamiento en alguno de los extremos del espectro de emisión. En estos casos bastante frecuentes, suele realizarse un procedimiento conocido como compensación. Para compensar se deben utilizar controles “*single stain*” de cada fluoróforo utilizado y se realiza igualando las medias de una población negativa con una población positiva. Para este análisis se debió realizar entonces un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones 50 μM y 100 μM durante 2,5 horas. Mediante la primera concentración se obtuvo un fenotipo apoptótico, que generó un marcado intenso con AV, lo que permitió compensar este fluorocromo. Con 100 μM se obtuvo un fenotipo necrótico, con el consecuente marcado de las células con IP, para permitir la compensación de este otro fluorocromo.



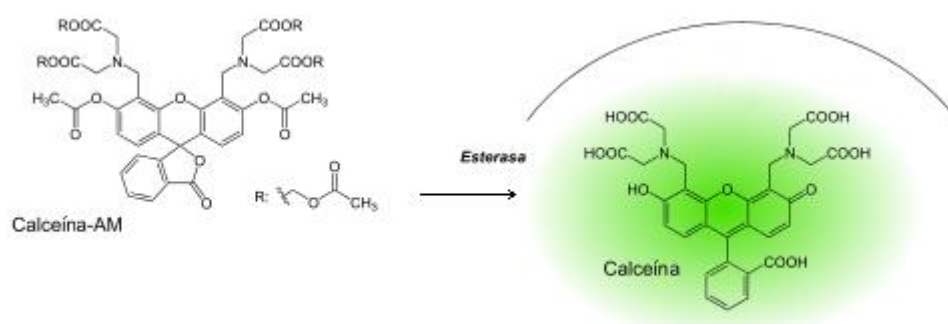
**Figura 12.** Espectros de emisión de los fluorocromos Alexa Fluor® 488 (ex/em: ~499/~520 nm) e Ioduro de Propidio (PI) (ex/em ~495/~635 nm) unido a ácidos nucleicos. Se utiliza el láser azul de 488 nm para excitar los fluoróforos en un citómetro BD Accuri™ C6. Se esquematizan los filtros empleados: para Alexa Fluor® 488, filtro 533/30, detector FL1 y para Ioduro de Propidio, filtro 670 LP, detector FL3. Espectros generados con el Software Spectrum viewer de BD Biosciences.

El análisis del mecanismo de muerte celular se realizó sobre epimastigotas de *T. cruzi* de concentración apropiada ( $2 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  parásitos/mL) incubados con el compuesto metálico, y se realizó también un control de viabilidad celular en ausencia de este compuesto. Los parásitos fueron colectados luego de un período de incubación de 3, 6 y 24 horas y lavados con PBS 1X frío. El *pellet* fue resuspendido en el tampón de unión de AV 1X provisto en el kit (3.1 Soluciones y tampones). Se agregó AV conjugada a Alexa Fluor 488 e IP y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de este período de incubación se analizaron las células teñidas en citómetro de flujo (BD Accuri C6, BD Biosciences), con un flujo de colección de 100  $\mu$ L/min. Se midió la emisión de fluorescencia con un filtro 533/30 (FL1) para AV y con un filtro 670 nm Long pass (FL3) para IP, usando una longitud de onda de excitación de 488 nm. Los datos fueron analizados con el programa BD CSampler software (BD Bioscience).

### 3.11 Tinción con Calceína-AM / Ioduro de propidio

Las células no marcadas por AV y/o IP no necesariamente se encuentran vivas, sino que podría tratarse de otro mecanismo de muerte celular el involucrado. Por esto, se complementaron los ensayos con marcadores de viabilidad y vitalidad celular, como los son el IP y la calceína (CA), respectivamente, para de esa manera discriminar que porcentaje de células no marcadas efectivamente estaban vivas.

Las células vivas se distinguen por la presencia de la actividad esterasa intracelular, que es determinada por la conversión enzimática de la calceína-AM no fluorescente en calceína intensamente fluorescente por parte de las células vitales. La calceína polianiónica es retenida dentro de las células vivas, produciendo una intensa fluorescencia verde uniforme en las células vivas ( $ex/em \sim 495 \text{ nm}/\sim 515 \text{ nm}$ ), como se muestra en la Figura 13. El IP entra en las células con membranas dañadas y se une a ácidos nucleicos, produciendo de esta manera una fluorescencia de color rojo brillante en las células muertas. El IP se excluye por la membrana plasmática intacta de células vivas. La determinación de la viabilidad celular se da entonces mediante la evaluación de estas propiedades físicas y bioquímicas de las células.

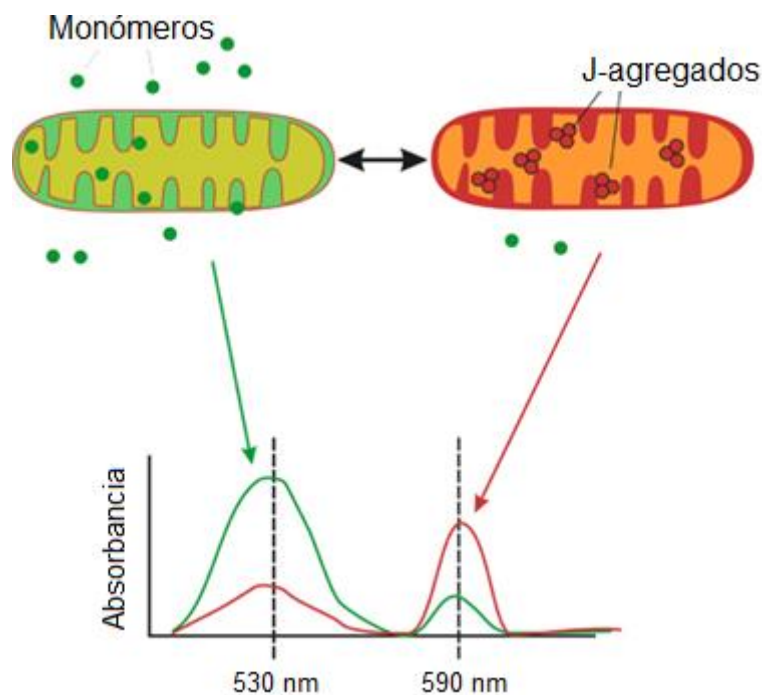


**Figura 13.** Conversión enzimática de la calceína-AM no fluorescente en calceína fluorescente por parte de las células vivas mediante las enzimas con actividad esterasa.

Para determinar entonces la vitalidad de los epimastigotas se centrifugó 1 mL de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL sin tratar e incubados con el compuesto durante 10 minutos a 1000 g. Se lavó con 1 volumen de PBS 1X y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 g. Se procedió a resuspender en 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X cada muestra y agregar 2  $\mu\text{L}$  de calceína  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  a una alícuota de 100  $\mu\text{L}$ . Se incubó 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se agregó 1  $\mu\text{L}$  de IP 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se incubó 15 minutos más en las mismas condiciones y se analizó en citómetro de flujo (BD Accuri C6, BD Biosciences), con un flujo de colección de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ , usando un filtro 533/30 (FL1) para CA y un filtro 670 nm Long pass (FL3) para IP, y una longitud de onda de excitación de 488 nm. Los datos fueron analizados con el programa BD CSampler software (BD Bioscience). Dado lo similar de las longitudes de onda de excitación (495 y 499 nm) y emisión (515 y 520) del fluoróforo de CA y AV, y que los filtros empleados para recoger la fluorescencia son los mismos, se emplearon los valores de compensación registrados para AV.

### 3.12 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Los cambios en el  $\Delta\Psi_m$  se analizaron usando el marcador lipofílico catiónico carbocianina 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide, JC-1 (Molecular Probes). En células saludables, este colorante se acumula de manera dependiente del potencial de membrana en las mitocondrias, generando J-agregados rojos. En células apoptóticas o no saludables, cuando ocurren cambios en el potencial de membrana, se genera un cambio en la fluorescencia de rojo a verde, ya que el colorante se encuentra ahora como monómero (Figura 14).



**Figura 14.** Esquema de acumulación de JC-1 en mitocondrias con potencial de membrana polarizado (agregados en rojo) y mitocondrias con potencial de membrana despolarizado (monómeros en verde).

Los J-agregados rojos ( $Ex_{560nm}/Em_{590nm}$ ) y los monómeros verdes ( $Ex_{485nm}/Em_{530nm}$ ) pueden ser entonces monitoreados por citometría de flujo. Consecuentemente, la despolarización de la membrana genera la disminución en la tasa de intensidades de fluorescencia rojo/verde (590 nm/530 nm), la cual también puede monitorearse en un lector de placas. Para estas determinaciones, los epimastigotas tratados por 6 y 24 horas con 1, 5 y 10x  $IC_{50}$  fueron lavados con PBS 1X y resuspendidos ( $1 \times 10^6$  parásitos/mL) en 1 mL de PBS 1X conteniendo JC-1 a una concentración final de 6  $\mu M$ . Los parásitos no tratados fueron incluidos como controles. Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron con un Varioskan Flash Spectral Scanning (Thermo Scientific) cada minuto durante 40 minutos a 590 y 530 nm. Para los análisis por



citometría de flujo, los parásitos fueron incubados en la oscuridad por 20 minutos a TA y lavados dos veces con PBS 1X para eliminar el colorante no internalizado. Las medidas fueron realizadas con un citómetro BD Accuri C6 y los datos analizados con el software BD CSampler™ software (BD). Se empleó un filtro 533/30 (FL1) para los monómeros verdes y un filtro 585/40 nm (FL2) para los J-agregados rojos, y una longitud de onda de excitación de 488 nm. Se realizaron dos experimentos independientes y se adquirieron 10000 eventos cada vez a un flujo de colección de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

### 3.13 Extracción de ARN de *T. cruzi*

Se aisló el ARN total de  $1 \times 10^8$  parásitos control y parásitos tratados con el compuesto metálico usando el reactivo Trizol (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del comerciante. Los parásitos centrifugados y lavados se resuspendieron en 1 mL de Trizol, lo que provoca la lisis celular. Se agregó cloroformo con lo cual se forma una mezcla capaz de ser separada por centrifugación, en dos fases, acuosa y orgánica. Como el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, el ADN en la interfase y las proteínas en la fase orgánica, al aislar la fase acuosa se puede precipitar el ARN con isopropanol. Finalmente se lava el ARN con etanol 75% y se solubiliza en de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas.

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

### 3.14 Cuantificación de ARN

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (ACTGene Asp-3700). Para determinar la pureza de la muestra se tuvo en cuenta el cociente  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$ , considerando la muestra como pura cuando esta relación es mayor o igual a 2 por tratarse de ARN. Para determinar la integridad de los ácidos nucleicos se realizaron ensayos en Bioanalyzer Agilent RNA 6000 Nano (Agilent Technologies).

### 3.15 RNA-Seq

Las librerías fueron construidas por el Servicio de secuenciación de MacroGen, Korea por captura de colas poli-A usando TruSeq RNA Sample Prep Kit v2, siguiendo el protocolo TruSeq RNA Sample Preparation v2 Guide, Part # 15026495 Rev. F, con el reactivo TruSeq rapid SBS. Se procedió a la secuenciación mediante la generación de *clusters*, la biblioteca se cargó en una celda de flujo donde los fragmentos se capturaron con oligos unidos a la superficie complementarios a los adaptadores de la biblioteca. Cada fragmento se amplificó a continuación en distintos *clusters* clonales a través de amplificación de tipo puente. Cuando la generación del clúster se completó, se procedió a la secuenciación. La tecnología Illumina SBS utiliza un método de terminación reversible que detecta bases individuales que se incorporan en las cadenas molde de ADN. Como los 4 son reversibles, los dNTPs terminales se mantienen durante cada ciclo de secuenciación, y la competencia natural minimiza el sesgo de incorporación y reduce en gran medida las tasas de errores brutos en comparación con otras tecnologías. El resultado es una secuenciación base a base muy precisa que prácticamente elimina los errores específicos del contexto de las secuencias, incluso dentro de las regiones de secuencias repetitivas y los homopolímeros. El protocolo de secuenciación empleado fue HiSeq 2500 System User Guide Part # 15011190 Rev. V HCS 2.2.70. La secuenciación de tipo *paired-end* de 101 pb fue realizada en un equipo HiSeq 2500. Los datos de secuenciación fueron convertidos en datos crudos para su análisis con el software HCS v2.2.

### 3.16 Análisis bioinformáticos

Los pasos de análisis de calidad de secuencia, recorte de lecturas (*trimming*), mapeo, cuantificación de lecturas, cálculos de expresión, estadística y búsqueda de genes con expresión diferencial, fueron realizados utilizando distintos programas que corren en línea de comando. Estos programas son: Fast QC para el análisis de secuencias (Andrews, 2010), Trimmomatic para el *trimming* (Bolger, 2014), Bowtie2 para el alineamiento (Langmead, 2012); HTSeq-count para contar las lecturas mapeadas por gen (Anders, 2015); y DESeq2 para aplicar la estadística y buscar los genes expresados diferencialmente (Love, 2014).

El programa Fast QC se emplea para el análisis de la calidad de las secuencias, y cuando fue necesario, la eliminación de las bases de mala calidad se realizó mediante el proceso de *trimming*. Se empleó para ello el programa Trimmomatic-0.35 y se recortaron las primeras 10 bases usando el comando HEADCROP: 10.

El programa Bowtie2 permite realizar los pasos de mapeo sobre la referencia genómica. Para el uso de este alineador es necesario indexar el genoma de referencia a utilizar con la herramienta bowtie-build. En este caso, se usó como referencia el genoma unido de las últimas versiones (*Release 29*) de los haplotipos Esmeraldo-Like y Non-Esmeraldo-Like, ambos descargados de la base de datos TriTrypDB.

El programa HTSeq-count v0.6.1p2 permite contar cuántas lecturas mapean sobre cada gen y construye una tabla con los identificadores de cada uno de los genes (ID) y el número de lecturas mapeadas sobre ese gen. El programa precisa como entrada el mapeo generado por Bowtie2 en formato *.sam* y además usa el archivo de anotación del genoma correspondiente en formato *.gff*. El programa se corrió con los parámetros por defecto de la versión 0.5.4.

El programa DESeq2 forma parte del proyecto Bioconductor de herramientas bioinformáticas para el entorno R. Para trabajar en este programa se preparó la tabla de ingreso, que consiste en este caso en los ID y los conteos de lecturas por gen para cada condición y réplica. Una vez en R, se crea otra tabla de referencia especificando la condición asignada a cada columna de la tabla anterior. Luego, se calculan los factores de normalización que el DESeq utiliza para ajustar las distintas réplicas y condiciones para que las mismas se vuelvan comparables. Los valores normalizados son ajustados a un modelo de distribución binomial negativa que permite la comparación de los mismos entre las condiciones estudiadas. De esta manera se obtuvo la tabla que presenta para cada gen el Fold Change (FC), es decir el cambio entre condiciones, el  $\log_2FC$ , el logaritmo en base 2 del FC, 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).

La identificación de estos transcritos incluye su clasificación respecto a determinado patrón de expresión y su funcionalidad utilizando herramientas de análisis públicos de ontología génica, como Blast2GO (Gotz, 2008) y TriTrypDB (Aslett, 2010) para determinar sobre y sub representación de ciertas vías, procesos o regiones específicas del genoma y de grupos de genes con el mismo comportamiento. Los genes con expresión alterada en parásitos tratados con el compuesto metálico se estudiaron como candidatos a blancos moleculares.

### 3.17 Retrotranscripción de ARN mensajero

Para generar el ADN copia (cDNA) se realizó la retrotranscripción del ARN usando hexámeros al azar como cebadores y la transcriptasa reversa SuperscriptII (Life Technologies). Brevemente, 5 µg de ARN molde fue incubado durante 5 minutos a 65 °C con 50 ng de hexámeros al azar, 1 µL de dNTPs 10 mM y agua hasta un volumen final de 12 µL. Luego se agregaron 4 µL de tampón de reacción 5x First-Strand Buffer para la transcriptasa reversa SuperscriptII, 2 µL de 0,1 M de DTT y 1 µL RNaseOUT (40 units/µL). Una vez incubado a 25 °C por dos minutos se añadió 1 µL (200 unidades) de la enzima, llegando un volumen final de 20 µL. Se incubó nuevamente a 25 °C por 10 minutos y luego a 42 °C por 50 minutos. La inactivación de la enzima se realizó a 70 °C durante 15 minutos.

### 3.18 PCR en tiempo real

Para verificar los genes relacionados con la respuesta al compuesto se realizaron réplicas técnicas de cada uno de los triplicados biológicos empleados para analizar el transcriptoma. Fueron empleados 10 ng/µL como molde para amplificar los genes seleccionados en la reacción de RT-PCR utilizando un par específico de cebadores para cada gen. La verificación de estos genes se determinó usando SensiFAST SYBR Hi-Rox Kit (Bioline). Este 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 2 minutos para activar la polimerasa, y luego 40 ciclos a 95°C por 5 segundos para desnaturalizar las hebras y 60°C durante 30 segundos para la hibridación de los cebadores. Se realizaron curvas de disociación de las muestras para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en un StepOnePlus Real-Time PCR System. Los datos obtenidos fueron procesados en una primera instancia con StepOnePlus™ Software v2.3.

Los cebadores fueron diseñados con la herramienta online de Thermo Fisher Scientific (<https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716>) (Tabla 2). Como control interno se empleó el gen de la treonil-tRNA sintetasa, el cual, según los datos transcriptómicos, no presenta variaciones entre el tratamiento y el control.

Se realizó el cálculo de eficiencia para cada par de cebadores a partir de la pendiente del gráfico  $C_T$  vs log concentración donde la eficiencia queda definida como: Eficiencia =  $[10^{-(1/pendiente)}]-1$ . Las concentraciones ensayadas se realizaron por diluciones seriadas y correspondieron a 20, 10, 5 y 2,5 ng de cDNA por reacción.

**Tabla 2.** Cebadores empleados para verificar genes diferencialmente expresados. F: *forward*, R: *reverse*.

Descripción	Cebador	Cebador 5' - 3'	Tm (°C)
<b>receptor-type adenylate cyclase</b>	TcCLB.510581.20 F	GTGCTGGGTGTGCTGTTTGG	62,5
	TcCLB.510581.20 R	ACACTCCAACGCTGGCACAA	60,5
<b>dual-specificity protein phosphatase</b>	TcCLB.511653.20 F	GGCGCTGCAATACGTACAC	62,5
	TcCLB.511653.20 R	CCTCCACGTCCATCGACTCC	64,6
<b>phosphomevalonate kinase protein</b>	TcCLB.507913.20 F	GTTACCGCGGCCAACTTACG	62,5
	TcCLB.507913.20 R	TTGTCATTGCAGCCGAGGAA	58,4
<b>cyclophilin</b>	TcCLB.510947.50 F	GGGACGGGCGGAGAGTCTAT	64,6
	TcCLB.510947.50 R	ACAGCCGACCCAGTGTGTT	62,5
<b>MRB1-associated protein</b>	TcCLB.509105.90 F	CGGAATTAGAGGGGGCAACC	62,5
	TcCLB.509105.90 R	TGAGCATCTCGAGCCTCACG	62,5
<b>CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase</b>	TcCLB.503925.80 F	CGTTAGCCCCACGCAAATCT	60,5
	TcCLB.503925.80 R	TGCCAAAACGACAAACGAA	56,4
<b>ubiquitin-conjugating enzyme E2</b>	TcCLB.509161.10 F	CTGCCGCTTCCAAGTTGCTT	60,5
	TcCLB.509161.10 R	CCCAAGCGCCACTTCTCTTG	62,5
<b>cAMP phosphodiesterase A</b>	TcCLB.511269.40 F	TCGCTGGATGACCCTGTCTG	62,5
	TcCLB.511269.40 R	TTTGGTTCGAAACGCCTGGT	58,4
<b>heat shock protein 85</b>	TcCLB.509105.140 F	TGCGACAAGATCCGCTACCA	60,5
	TcCLB.509105.140 R	GGGATCACGCGGATACGAAG	62,5
<b>eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3</b>	TcCLB.511383.40 F	GCATCATTGCCTCGTTGCAC	60,5
	TcCLB.511383.40 R	GTTTCCTCGTGTGGGGTTGC	62,5
<b>malic enzyme, putative</b>	TcCLB.505183.30 F	ATTGACCCCCGGCTAATCGT	60,5
	TcCLB.505183.30 R	CGTTTCTCACGCATGCCAAG	60,5
<b>cytochrome P450 reductase</b>	TcCLB.510657.170 F	TGGCACGTGTGTGGAGATCA	60,5
	TcCLB.510657.170 R	CTCCGTCTGCTTCCCCAGAA	62,5
<b>threonyl-tRNA synthetase</b>	TcCLB.508299.80 F	ACCGCATACGCCACGAAAGT	60,5
	TcCLB.508299.80 R	CTTGCCAATGTGCGTTGC	60,5

La determinación de los valores relativos de ARN se realizó mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak, 2011). Para ello, el primer valor de  $\Delta C_T$  se obtuvo normalizando los valores contra el gen control de la treonil-tRNA sintetasa, y en segunda instancia, el  $\Delta\Delta C_T$  se calculó en relación a las muestras control.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Actividad *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi*

#### 4.1.1 Determinación del IC<sub>50</sub> de compuestos metálicos

Una forma de determinar la capacidad antiproliferativa de los compuestos basados en paladio, platino y vanadio, diseñados anti-*T. cruzi*, consiste en evaluar la concentración de compuesto necesaria para inhibir al 50% la proliferación de parásitos incubados comparados con parásitos control en ausencia de compuesto. Este valor se conoce como IC<sub>50</sub>. Para determinar dicho valor de IC<sub>50</sub> de los compuestos basados en paladio, platino y vanadio sobre epimastigotas de la cepa CL Brener de *T. cruzi*, primero se analizaron amplios rangos de concentraciones y así se determinó el rango de análisis apropiado para cada uno de ellos. Se incluyó además el fármaco de referencia Nifurtimox. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron sobre células VERO, y sobre macrófagos J-774. A partir de estos valores se determinó el valor de Índice de Selectividad (IS) para cada uno de los compuestos. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Actividad *in vitro* de los compuestos de Pt, Pd y VO contra *T. cruzi* (epimastigotas de la cepa CL Brener), citotoxicidad sobre células normales de mamífero y valores de índice de selectividad (IS). Al menos dos experimentos independientes se utilizaron para calcular el IC<sub>50</sub> y cada experimento constó de tres réplicas.

Compuesto	IC <sub>50</sub> <i>T. cruzi</i> ± SD (μM)	IC <sub>50</sub> Células VERO ± SD (μM)	IC <sub>50</sub> J-774 MØ ± SD (μM)	IS <sup>c</sup>
Pt-dppf-mpo	0,060 ± 0,003	5,1 ± 3,3 <sup>a</sup>	ND	85
Pd-dppf-mpo	0,30 ± 0,03	24,5 ± 12,2 <sup>a</sup>	ND	83
[VO(naphthgly-2H)(bipy)]·H <sub>2</sub> O	>32	55,0 ± 9,7	ND	<2
[VO(naphthgly-2H)(phen)]·H <sub>2</sub> O	3,53 ± 0,26	49,2 ± 13,9	ND	14
VO(naphth-2H)(aminophen)	3,00 ± 0,22	30,6 ± 4,5	ND	10
[VO(naphthgly-2H)(epoxyphen)]·½H <sub>2</sub> O	4,69 ± 0,22	30,3 ± 7,7	ND	7
[VO(naphthgly-2H)(dppz)]·2.5 H <sub>2</sub> O	1,41 ± 0,14	81,8 ± 15,9	ND	58
[VO(naphthgly-2H)(tdzp)]·1.5 H <sub>2</sub> O	4,17 ± 0,16	60,6 ± 14,7	ND	15
[VO(5BrSalgly-2H)(bipy)]·2H <sub>2</sub> O	25,0 ± 7,0	134 ± 34	ND	5
VO(5BrSalgly-2H)(phen)	2,49 ± 0,15	43,6 ± 16,6	ND	18
[VO(5BrSalgly-2H)(aminophen)]·2H <sub>2</sub> O	2,09 ± 0,08	122 ± 37	ND	58
[VO(5BrSalgly-2H)(epoxyphen)]·2.5H <sub>2</sub> O	3,91 ± 0,13	92,0 ± 14,9	ND	24
[VO(5BrSalgly-2H)(dppz)]·½H <sub>2</sub> O	1,69 ± 0,49	50,1 ± 12,5	ND	30
[VO(5BrSalgly-2H)(tdzp)]·2H <sub>2</sub> O	2,00 ± 0,16	35,4 ± 7,3	ND	18
[VO(salgly-2H)(dppz)]·H <sub>2</sub> O	1,48 ± 0,28	36,6 ± 5,9	ND	25
[VO(salgly-2H)(tdzp)]·3H <sub>2</sub> O	3,93 ± 0,17	139 ± 50	ND	35
VO(L2-2H)(aminophen)	3,76 ± 0,08	ND	50 ± 2 <sup>b</sup>	13
Nifurtimox	2,76 ± 0,19	ND	316,0 ± 0,5 <sup>b</sup>	115

<sup>a</sup> (Rodríguez Arce, 2015)

<sup>b</sup> (Fernández, 2013)

<sup>c</sup> Índice de selectividad (IS): IC<sub>50</sub> células mamífero/IC<sub>50</sub> *T. cruzi*

ND: no determinado

De acuerdo a los datos reportados para Pd y Pt determinados para la cepa Dm28c, se observa una mayor sensibilidad por parte de la cepa CL Brener frente a estos compuestos. Particularmente, el IC<sub>50</sub> de Pd disminuye 2 veces y para Pt esta disminución es de casi 5 veces (Rodríguez Arce, 2015). Esta reducción en la concentración de compuesto necesaria para inhibir el crecimiento de la mitad de los parásitos puede deberse, en parte, a diferencias inter cepas que justifiquen una mayor susceptibilidad de la cepa empleada frente a la cepa reportada. Dentro de las 6 DTUs reconocidas por consenso internacional (Zingales, 2009), la cepa Dm28c pertenece al grupo I (TcI), mientras que CL Brener al grupo VI (TcVI). Pertenecer a distintas DTU implica diferencias en muchos aspectos, como ser epidemiología, polimorfismo, tropismo, virulencia o constitución antigénica. Por ejemplo, TcII, TcV y TcVI causan la enfermedad predominantemente en países del Cono Sur, donde megaesófago y megacolon son más comunes (Breniere, 2002; Cardinal, 2008; Virreira, 2006). Por su parte, TcI predomina en América del Norte hasta el Amazonas (Ramirez, 2010; Sanchez-Guillen Mdel, 2006), aunque no es infrecuente en pacientes de otras regiones (Burgos, 2010). Además, TcI muestra espectacular abundancia entre hospederos salvajes y vectores a lo largo de la gama endémica de *T. cruzi*, especialmente, pero no exclusivamente, en asociación con *Didelphis sp. opossums* (Miles, 2009; Yeo, 2005). En tanto, otras cepas correspondientes a TcII, V y VI, son raramente aisladas de reservorios naturales o triatomíneos (Franzen, 2011).

En el caso del compuesto VO, V<sup>IV</sup>O(L2-2H)(aminophen), se observa una menor sensibilidad de la cepa en estudio, ya que se necesita casi 14 veces el valor de IC<sub>50</sub> reportado para la cepa Tulahuen 2 (TcVI) para inhibir el crecimiento del 50% de parásitos de la cepa CL Brener (Fernández, 2013). Esto también podría ser explicado por un mecanismo de acción diferente dado que se trata de distintas DTU. El resto de los compuestos, pertenecientes a la otra familia de oxidovanadio(IV), fueron testados hasta el momento solo en la cepa CL Brener y sus valores de IC<sub>50</sub> varían en el rango de micromolar, no superando en general los 5 µM para la cepa en estudio.

Por su parte, los valores de IS varían de acuerdo a los valores determinados para las células VERO, dado que este índice es calculado como el IC<sub>50</sub> en células mamífero sobre el IC<sub>50</sub> sobre *T. cruzi*. Para los compuestos de paladio y platino se obtienen excelentes valores de IS,

considerándose como aceptable un IS de al menos 10. Desde los datos reportados por el grupo para la cepa Dm28c, se puede observar que en estos compuestos de la línea dppf-mpo, la inclusión de ferroceno en la esfera de coordinación del metal aumenta considerablemente la lipofilia del compuesto, aumentando su concentración dentro del parásito y disminuyendo el valor de IC<sub>50</sub> (Rodríguez Arce, 2015). Se debe notar que un aumento de permeabilidad al compuesto permitiría también el ingreso del compuesto a las células normales de mamífero, pero los altos IS demuestran que los mecanismos moleculares afectados son específicos del parásito y no de dichas células. De esta manera, un mayor ingreso del compuesto no generaría la muerte celular hasta el empleo de más de 80 veces el valor de IC<sub>50</sub> necesario para evitar la proliferación de los parásitos.

Por su parte, los compuestos basados en vanadio presentan variados valores de IS, siendo tres de ellos no aceptables para terapia por no superar el valor estipulado de 10, por lo que son considerados demasiados citotóxicos para las células del mamífero hospedero. El resto presenta de buenos a muy buenos valores de IS, destacándose los compuestos [VO(naphthgly-2H)(dppz)]·2.5 H<sub>2</sub>O y [VO(5Brsalgly-2H)(aminophen)]·2H<sub>2</sub>O, con un valor de IS de 58 (Tabla 3).

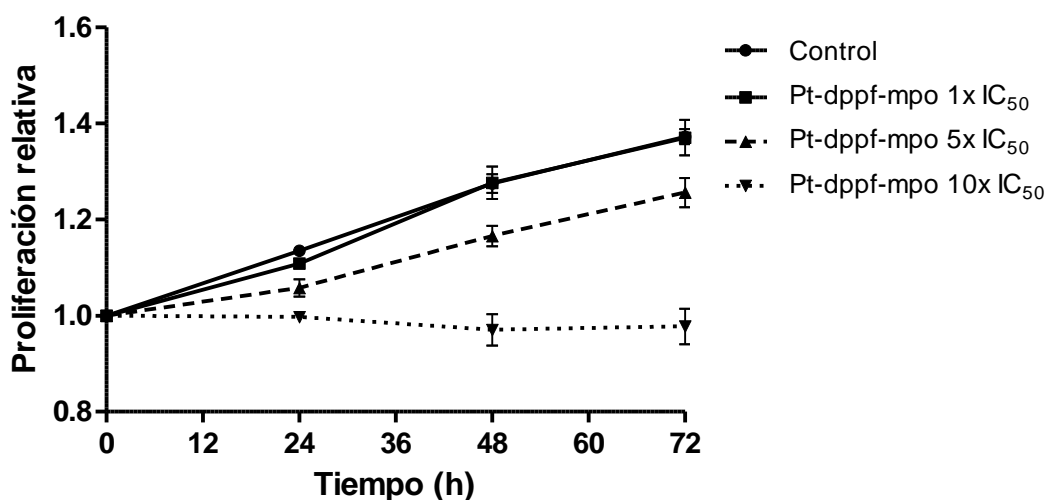
Finalmente, el IC<sub>50</sub> del fármaco de referencia Nifurtimox en la cepa CL Brener es aproximadamente la mitad al valor reportado para la cepa Tulahuen 2 de  $7,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$  (Fernández, 2013). Para este fármaco el valor de IS es 2,8 veces mayor para la cepa en estudio que para la cepa Tulahuen 2, alcanzando un valor de IS de 115.

La determinación del valor de IC<sub>50</sub> para cada uno de los compuestos sintetizados, en combinación con los datos de IS, que involucra la citotoxicidad del compuesto, es una poderosa herramienta para en una primera instancia descartar compuestos con poca efectividad contra *T. cruzi*, en el caso de que presenten altos valores de IC<sub>50</sub>, o muy citotóxicos si presentan bajos valores de IS. El compuesto que más se destaca en este sentido es el Pt-dppf-mpo, el cual presenta un valor nanomolar de IC<sub>50</sub> y un excelente valor de IS. Es por ello, que en el presente trabajo se realizará la evaluación de los efectos de la exposición al mismo sobre la biología celular y la expresión génica del parásito, a fin de caracterizar el tipo de muerte celular que ejerce y que genes o vías metabólicas están afectadas en los parásitos tratados para tratar de comprender su mecanismo de acción en el parásito.



### 4.1.2 Recuperación de parásitos

Se considera a un compuesto como tripanocida cuando conduce a un arresto irreversible del crecimiento celular *in vitro*. Por su parte, un compuesto tripanostático es aquel que ejerce su efecto inhibiendo la proliferación pero de manera reversible si se elimina del medio. Esto se determina usualmente en experimentos de “lavado” en los cuales los cultivos de parásitos son expuestos por un período de tiempo a un compuesto y luego analizados por otro período, cuando el compuesto ha sido removido del medio de cultivo (Kessler, 2013). Para evaluar entonces el efecto tripanostático o tripanocida del compuesto Pt-dppf-mpo, se realizaron experimentos de recuperación incubando parásitos con concentraciones de compuesto equivalentes a 1x, 5x y 10x  $IC_{50}$  durante 4 horas, puesto que este tiempo es suficiente para la activación de las vías de muerte celular programadas (Kessler, 2013). Después de eliminar el compuesto del medio de cultivo, se evaluó la recuperación del crecimiento de los parásitos en un medio libre de compuesto durante 24, 48 y 72 horas mediante medidas de absorbancia a 595 nm (Figura 15).



**Figura 15.** Ensayos de recuperación de parásitos luego de 4 horas de incubación con el compuesto Pt-dppf-mpo. Se grafica la proliferación de parásitos relativa a tiempo cero durante 24, 48 y 72 horas post-incubación.

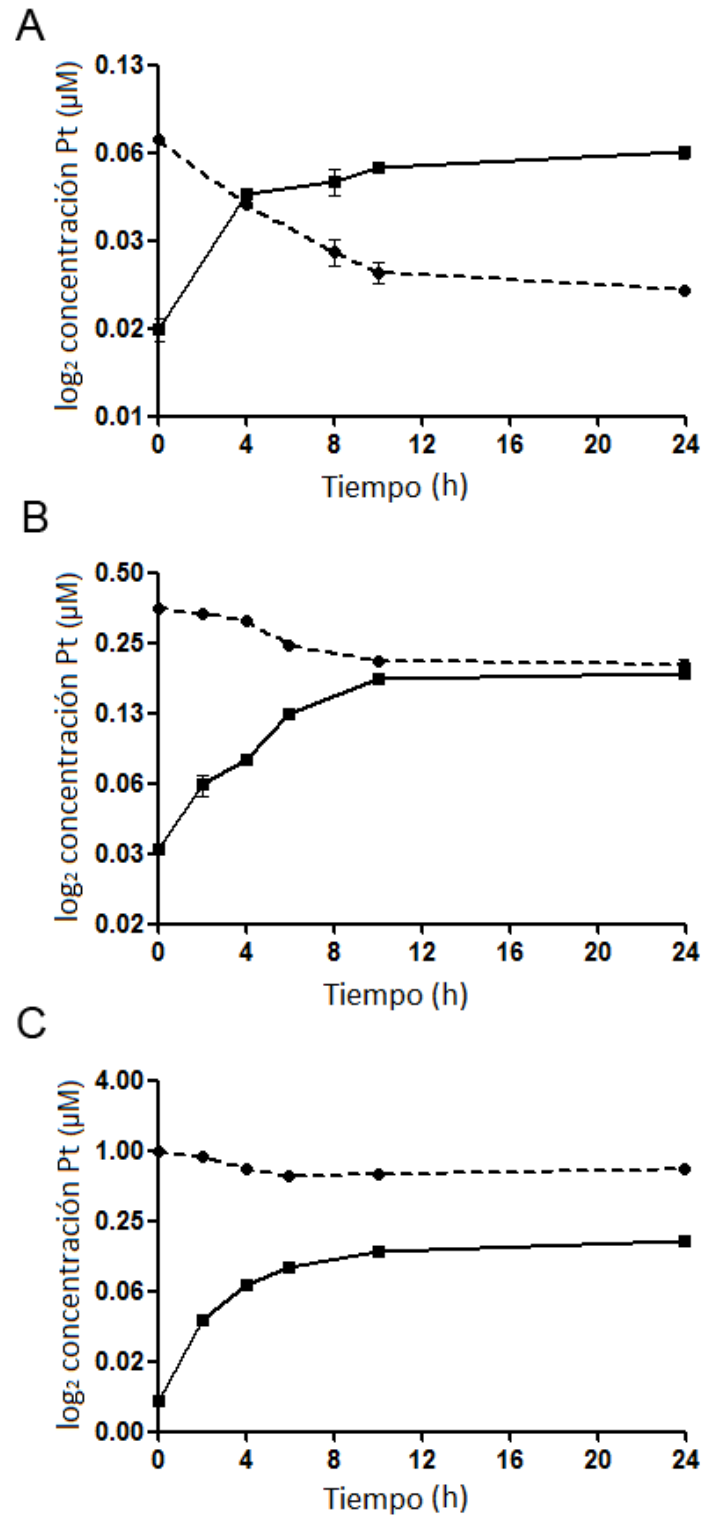
Los parásitos tratados con Pt-dppf-mpo en una concentración equivalente al valor  $IC_{50}$ , mostraron un crecimiento normal similar al de los parásitos control no tratados luego de ser transferidos a un medio fresco libre de fármaco después de 4 horas de incubación (Figura 15). Sin embargo, los parásitos tratados durante 4 horas con 5x el valor  $IC_{50}$  calculado, reanudaron su crecimiento aproximadamente un 10% más lento que los parásitos control (Figura 15). Finalmente, con 10x  $IC_{50}$  perdieron su capacidad para reanudar el crecimiento cuando se

incubaron en medio fresco libre de compuesto durante todo el tiempo de observación, incluso después de 24 horas (Figura 15).

Un gran número de variantes pueden afectar el hecho de que un compuesto sea catalogado como tripanocida o tripanostático, incluyendo la concentración del compuesto utilizado, la duración de la exposición al compuesto, el número de parásitos empleados al inicio del experimento, y el tiempo de observación luego de que el inhibidor fue removido. Nótese que un compuesto tripanocida puede catalogarse como tripanostático si la concentración o el tiempo de exposición son insuficientes. Dado que los compuestos tienen diferentes valores de  $IC_{50}$ , la literatura recomienda caracterizar la capacidad tripanocida o tripanostática en referencia al valor de  $IC_{50}$  y a los tiempos de incubación y observación (Buckner, 2011). En este caso, *T. cruzi* expuesto a Pt-dppf-mpo a una concentración de 10 veces el  $IC_{50}$  por 4 horas no recupera su crecimiento luego de un período de observación de 72 horas. Esto determina que Pt-dppf-mpo es compuesto tripanocida bajo esas condiciones de experimentación.

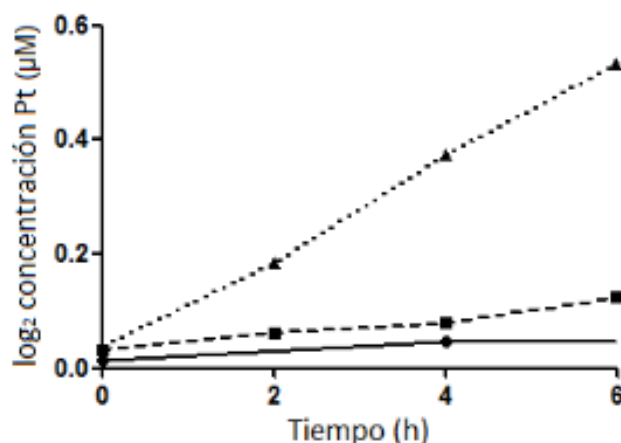
#### 4.1.3 Índice de captura

Con el fin de determinar la captura de platino, se incubaron epimastigotas con Pt-dppf-mpo y la cantidad de platino ingresada y/o fuertemente unida por los parásitos (no removible por lavado), así como el platino que permanecía en el medio de cultivo fueron cuantificados. Los resultados de dos experimentos independientes, incubando los parásitos con cantidades crecientes de platino total (0,06  $\mu$ M, 0,30  $\mu$ M y 0,60  $\mu$ M) se muestran en la Figura 16. Cuando se usan 0,06  $\mu$ M de concentración de compuesto de platino total, la incorporación de metal aumenta hasta 6 horas después de la incubación, cuando se estabiliza. Después de 24 horas de incubación, la cantidad de platino incorporado alcanzó 0,045  $\mu$ M que corresponde al 75% de la cantidad inicial de platino añadido al experimento (Figura 16 A). Análogamente, se estimó una captación de metal proporcionalmente menor, de 48% y 19%, cuando se utilizó una concentración de metalofármaco de 0,30  $\mu$ M y 0,60  $\mu$ M, respectivamente (Figura 16 B y C).



**Figura 16.** Concentración de Pt-dppf-mpo en parásitos en función del tiempo post-incubación. Los parásitos se incubaron con 0,06  $\mu\text{M}$  (A), 0,30  $\mu\text{M}$  (B) y 0,60  $\mu\text{M}$  (C) de Pt-dppf-mpo correspondiente a 1x  $\text{IC}_{50}$ , 5x  $\text{IC}_{50}$  y 10x  $\text{IC}_{50}$  respectivamente. El platino fuertemente unido a las células (cuadrados con líneas continuas) y platino en el medio (círculos con líneas punteadas) se analizaron mediante un ensayo de espectrometría de absorción atómica electroterámica a los tiempos indicados. Para 0,06 y 0,30  $\mu\text{M}$  dos experimentos independientes se realizaron y el promedio se presenta con SD.

Dado que la incorporación hasta las 6 horas permanece lineal, se pueden realizar ajustes lineales que permiten calcular la velocidad a la que el platino ingresa y/o es unido fuertemente por los parásitos (Figura 17). Para  $4 \times 10^7$  células en  $0,06 \mu\text{M}$  de platino total, la pendiente es de  $0,0043 \mu\text{M h}^{-1}$ . Dado que el volumen del medio de cultivo era de 4 mL, se tomaron  $1,7 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$  de platino por hora en  $4 \times 10^7$  células, correspondiente a la unión de  $4,3 \times 10^{-7}$  pmoles de platino  $\text{h}^{-1} \text{ célula}^{-1}$ . Para  $4 \times 10^7$  parásitos incubados con  $0,30 \mu\text{M}$  de platino total, se obtiene una pendiente de  $0,0145 \mu\text{M platino h}^{-1}$ . Esto produce una velocidad de  $1,45 \times 10^{-6}$  pmol  $\text{h}^{-1}$  para la unión de platino en cada parásito celular. Finalmente, con  $0,60 \mu\text{M}$ , la pendiente de  $0,0837 \mu\text{M h}^{-1}$  permitió calcular una tasa de  $8,37 \times 10^{-6}$  pmol  $\text{h}^{-1}$  para la fijación de platino por parásito. Se observa por tanto, durante las primeras 6 horas, una tasa de ingreso en aumento conforme se agrega mayor concentración de compuesto.

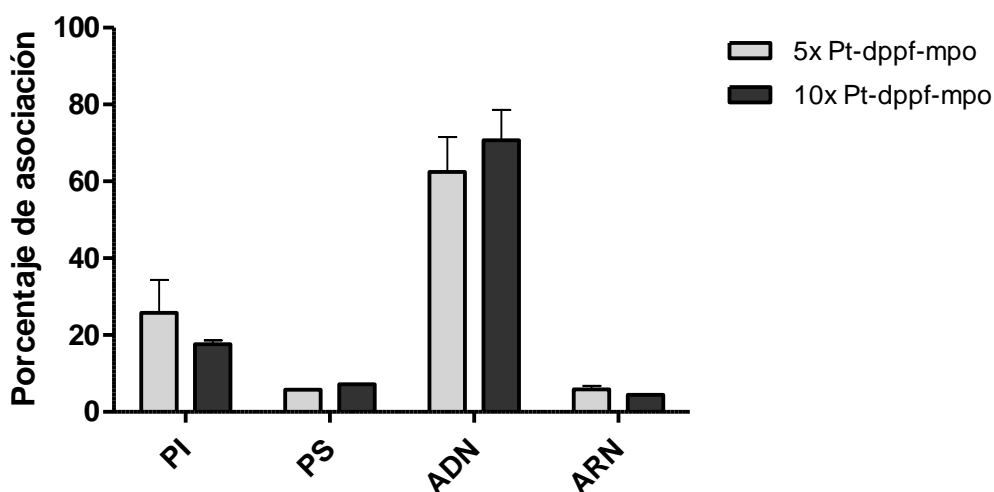


**Figura 17.** Concentración de Pt-dppf-mpo capturada por parásitos. Las cantidades de Pt-dppf-mpo se determinaron por ensayo de espectrometría de absorción atómica electrotrémica para los tiempos indicados. Los parásitos se incubaron con las siguientes concentraciones de Pt-dppf-mpo:  $0,06 \mu\text{M}$  (círculos con líneas continuas);  $0,30 \mu\text{M}$  (cuadrados con líneas discontinuas) y  $0,60 \mu\text{M}$  (triángulos con líneas punteadas). Los ajustes lineales para cada regresión fueron:  $\log_2 \text{Pt} = 0,0043 \pm 0,0011t$  ( $R^2 = 0,803$ ) para  $0,06 \mu\text{M}$ ,  $0,0145 \pm 0,0013t$  ( $R^2 = 0,955$ ) para  $0,30 \mu\text{M}$  y  $0,0837 \pm 0,0028t$  ( $R^2 = 0,998$ ) para  $0,60 \mu\text{M}$ . Las tasas de incorporación de platino se calcularon a partir de las pendientes. Para  $0,06$  y  $0,30 \mu\text{M}$  dos experimentos independientes se realizaron y el promedio se representa con SD. Se obtuvieron ajustes lineales a partir de la gráfica de regresión lineal utilizando GraphPad Software.

Es importante notar que en todos los casos se mide el platino como elemento, no siendo posible identificar su especiación, es decir, la forma química en la que se encuentra el compuesto dentro de la célula, dado que pudo haber sufrido diversas modificaciones químicas o enzimáticas que modifiquen su estructura inicial.

#### 4.1.4 Asociación a macromoléculas

Para analizar la distribución del compuesto metálico en el parásito, se evaluó la asociación de Pt-dppf-mpo con macromoléculas de diferente naturaleza. Las distintas macromoléculas fueron obtenidas mediante protocolos estándar luego de cada tratamiento y se cuantificaron en un espectrofotómetro de microvolúmenes, determinando para ADN un promedio de concentración de 176,3 ng/ $\mu$ L, y para ARN un promedio de 852,1 ng/ $\mu$ L. Para proteínas solubles e insolubles las concentraciones analizadas fueron de 17,8 y 0,98 mg/mL, respectivamente. La concentración de platino en cada muestra fue cuantificada por espectrometría de absorción atómica electrotrémica y los resultados se detallan en la Figura 18.



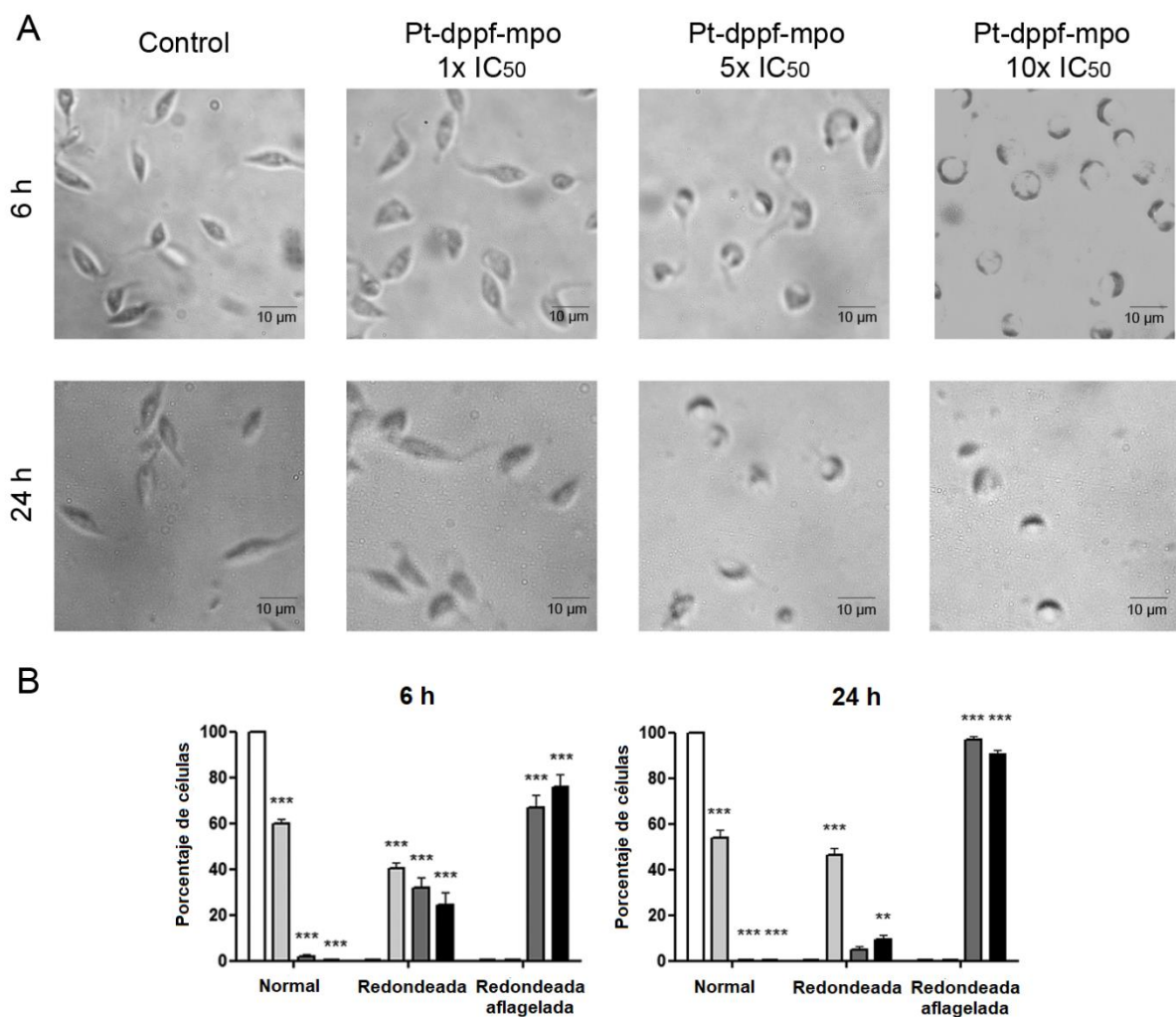
**Figura 18.** Porcentaje de concentración de platino asociado a las distintas macromoléculas aisladas, luego de 6 horas de incubación con 5x y 10x IC<sub>50</sub>. Se muestra el promedio y el SD de duplicados independientes de determinaciones de platino en ADN, ARN, proteínas solubles (PS) e insolubles (PI).

En las muestras de proteínas solubles y de ARN la cantidad de metal asociado no supera el 7% de asociación para 5x y 10x IC<sub>50</sub>. Por su parte, se detectó en promedio un 21% del platino total asociado a proteínas insolubles para ambos tratamientos. Finalmente, la asociación preferencial del compuesto se da con el ADN, con un promedio de 66%. Esta asociación preferencial con el ADN concuerda con lo ya descrito para otros compuestos basados en platino, donde se observaron cambios conformacionales del ADN, sin escisión de bases (Vieites, 2011). Los porcentajes de asociación para el tratamiento con 5x o 10x IC<sub>50</sub> no presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual sugiere que la asociación del compuesto con las macromoléculas del parásito es independiente de su concentración.

## 4.2 Evaluación celular

### 4.2.1 Microscopía de campo claro

Para determinar si habían cambios morfológicos en los parásitos como respuesta al tratamiento con el compuesto Pt-dppf-mpo, se realizaron incubaciones a diferentes tiempos y concentraciones. Específicamente, se tomaron imágenes de microscopía a 6 y 24 horas de incubación con concentraciones correspondientes a 1, 5 y 10 veces el IC<sub>50</sub> determinado para el compuesto (Figura 19).



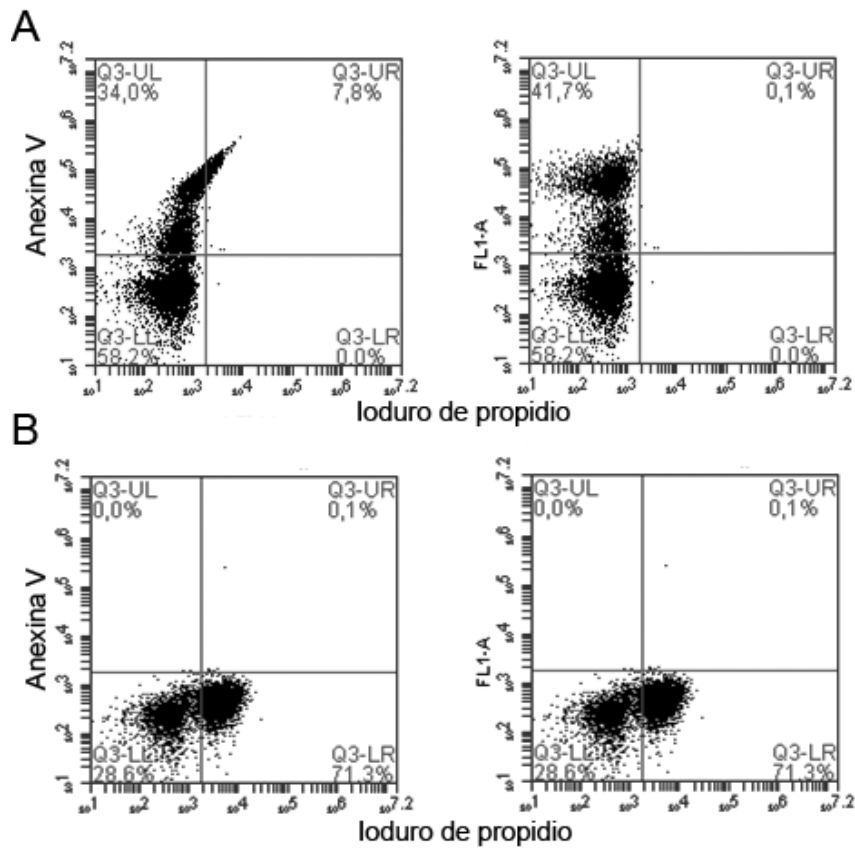
**Figura 19.** Efecto del tratamiento con el compuesto de platino sobre la morfología celular de epimastigotas de *T. cruzi*. **A.** Imágenes de microscopía de luz de cultivos *in vitro* de epimastigotas luego de 6 y 24 horas de incubación con las concentraciones indicadas. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes. Parásitos sin tratar fueron incluidos como control. **B.** Porcentaje de parásitos con morfología normal, redondeada o redondeada aflagelada, en parásitos control (blanco) o tratados con 1x (gris claro), 5x (gris oscuro) o 10x IC<sub>50</sub> (negro). El ensayo fue realizado con dos réplicas biológicas y al menos 100 parásitos fueron contados en cada experimento. Test de ANOVA: \*\* =  $P < 0.01$ , \*\*\* =  $P < 0.001$ .

La observación de este ensayo permite detectar parásitos con morfología redondeada y pérdida de movilidad, en algunos casos debido a la pérdida de flagelo. Particularmente, se observa una disminución significativa de parásitos con morfología normal al aplicar el tratamiento, con todas las concentraciones, incluso a las 6 horas de incubación (Figura 19, A). A las 24 horas, ya no se encuentran parásitos con morfología normal en cultivos incubados con 5x y 10x IC<sub>50</sub>. Consecuentemente, se observa un aumento de parásitos con morfología redondeada, con un mayor incremento en parásitos que incluso pierden el flagelo con las mayores dosis de compuesto, 5x y 10x IC<sub>50</sub>. Luego de 24 horas de incubación, incubando los parásitos a una concentración equivalente a un IC<sub>50</sub> no se observa pérdida de flagelo en los parásitos tratados, pero este fenotipo sí se observa con las mayores concentraciones (Figura 19, B). Este ensayo demostró que la morfología celular se ve alterada en presencia del compuesto metálico seleccionado conforme aumenta su concentración el tiempo de incubación de 6 a 24 horas.

#### 4.2.2 Tipo de muerte celular

Para determinar el mecanismo de muerte celular que induce el complejo metálico se utilizaron sondas fluorescentes de AV e IP como marcadores de apoptosis temprana (AV<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>) y apoptosis tardía/necrosis (AV<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo. Los tiempos analizados fueron de 3, 6 y 24 horas y las concentraciones de compuesto de 1, 5 y 10 veces el IC<sub>50</sub> determinado.

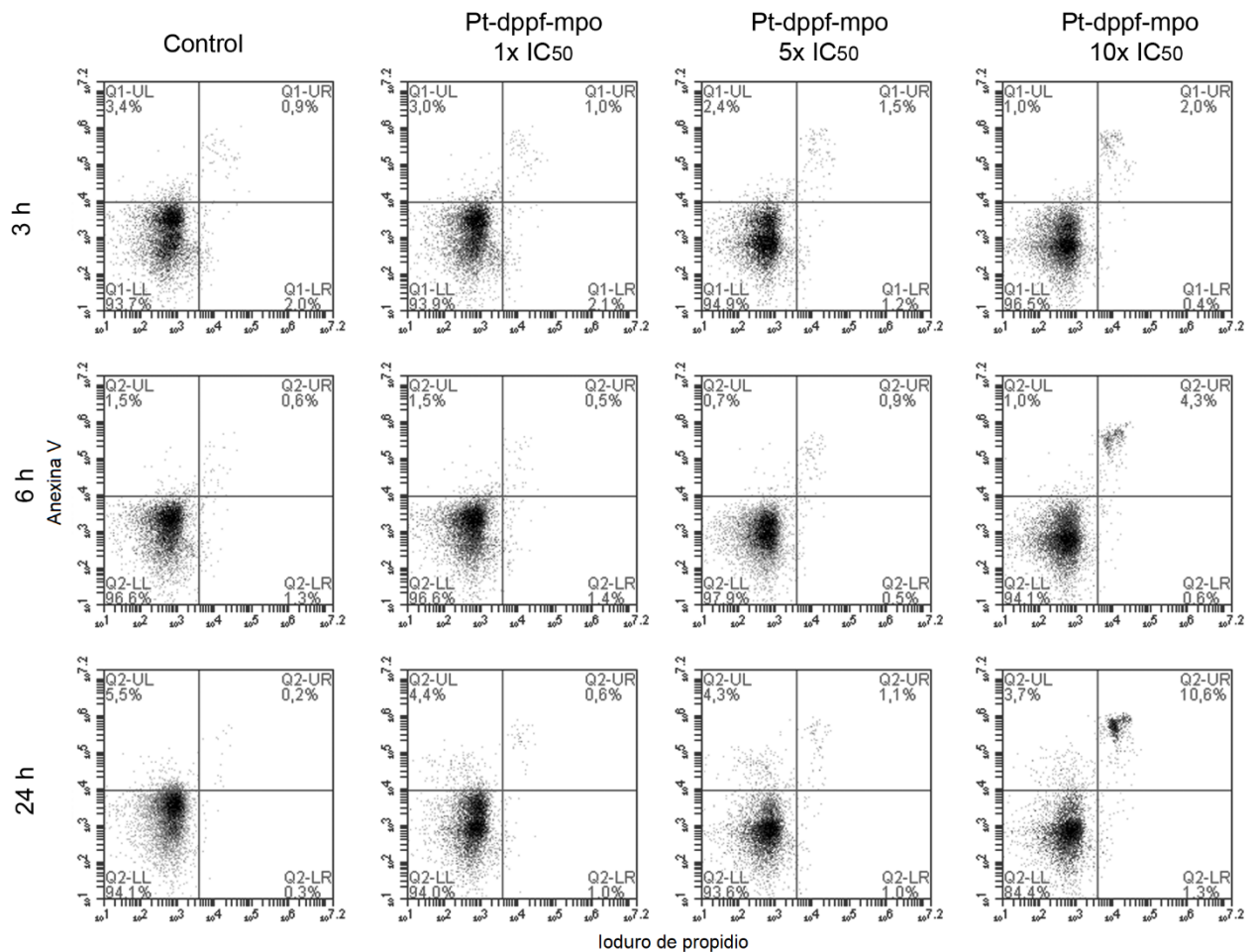
Dado que el espectro de emisión del fluoróforo de la AV (Alexa 488) se solapa con el espectro de emisión del IP (Figura 12 y Figura 20, A), se requiere realizar una compensación para trabajar con ambas sondas combinadas. El porcentaje de compensación para FL3 (1,67%) se obtuvo empleando controles *single stain* igualando las medias de una población negativa con una población positiva. Para obtener una población positiva para AV, se realizó un tratamiento con 50 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 2,5 horas lo cual resulta en un fenotipo apoptótico, que genera un marcado intenso con AV. Para obtener la población positiva para IP, se generó un fenotipo necrótico incubando los parásitos con 100 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 2,5 horas. Para el caso del marcado *single stain* con IP no se observa traspaso de fluorescencia de un detector a otro, por lo que no fue necesario compensar las poblaciones. Esto también puede ser visualizado en la Figura 12, ya que el filtro 533/30 mide en un rango anterior al del inicio de la curva de emisión del IP. Las poblaciones obtenidas antes y después de realizar la compensación se observan en la Figura 20.



**Figura 20.** Compensación de los fluorocromos correspondientes a IP y AV. En FL3 se representa loduro de propidio (IP) y en FL1 Anexina V (AV). **A.** Tinción de parásitos con AV luego de tratamiento apoptótico con 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 2,5 horas; izquierda: poblaciones sin compensar, derecha: poblaciones compensadas. **B.** Tinción de parásitos con IP luego del tratamiento necrótico con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 2,5 horas. Para este fluorocromo las poblaciones no debieron ser compensadas.

En la Figura 21 se muestran los resultados del marcado de parásitos con AV e IP, incubados con diferentes concentraciones del compuesto Pt-dppf-mpo durante 3, 6 y 24 horas, con el que se determinó el tipo de muerte celular inducido.





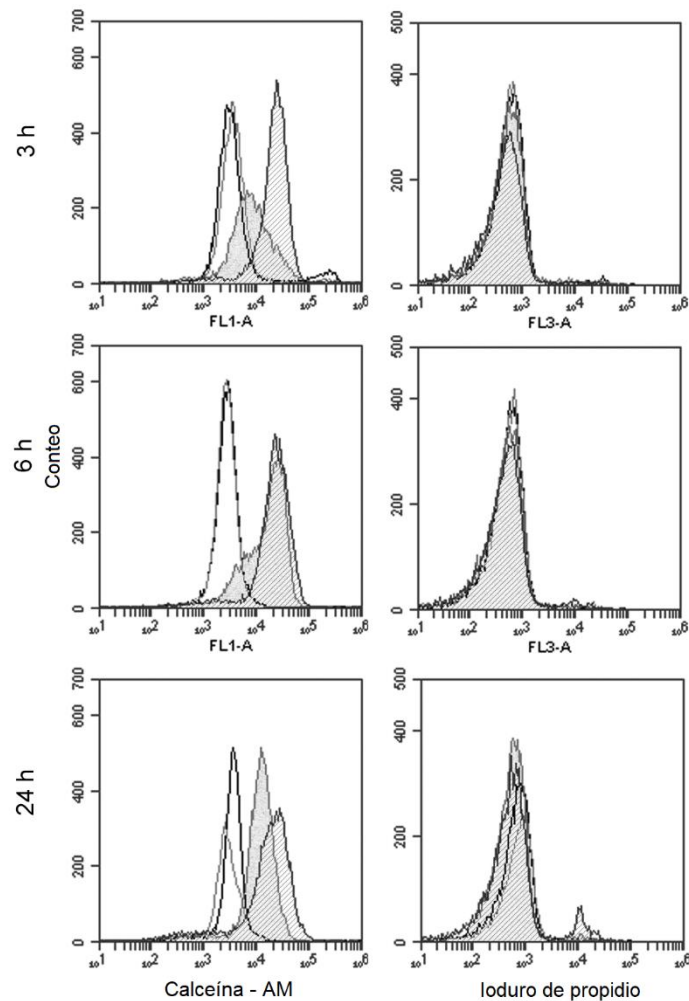
**Figura 21.** Análisis por citometría de flujo del tipo de muerte celular inducido por el compuesto de platino. Los parásitos, luego de incubados con el compuesto a los tiempos y con las concentraciones indicadas, fueron marcados con AV e IP, como marcadores de apoptosis y necrosis, respectivamente. Parásitos no tratados fueron usados como control. Se observan *dot plots* representativos de parásitos control y tratados con el compuesto, analizados en un citómetro Accuri C6 (BD Bioscience). Las imágenes muestran la intensidad de fluorescencia de los parásitos marcados correspondientes a uno de los dos experimentos realizados. Para generar los *dot plots* se utilizó el programa BD CSampler Software.

En el experimento realizado con el compuesto de platino, el control de parásitos sin tratar muestra un 95% de doble negativos que corresponderían a parásitos viables y un bajo porcentaje de parásitos positivos para AV e IP (Figura 21, control). En parásitos tratados con 1x y 5x IC<sub>50</sub>, durante las primeras 6 horas no se observa un aumento del marcado con AV/IP significativo, por tanto no se evidencia inducción de apoptosis o necrosis, la cual comienza a evidenciarse luego del tratamiento con 10 veces el valor de IC<sub>50</sub> durante 6 horas. La inducción necrótica se hace más evidente luego de 24 horas de tratamiento con 10x IC<sub>50</sub>, donde se observa una doble marcación con AV e IP, representando los parásitos marcados, un 10,6% de la población total.

Para el caso del compuesto de estudio, Pt-dppf-mpo, la inducción de la necrosis no parece estar precedida por un mecanismo de apoptosis temprana, dado que no se observan parásitos AV<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> incluso luego de tiempos cortos de incubación, descartando que la doble marcación observada a 24 horas corresponda a una apoptosis tardía. Además, se comprobó que esta técnica permite identificar correctamente la apoptosis como tipo de muerte celular luego de 24 horas de tratamiento, ya que durante la puesta a punto se trabajó en paralelo con algunos de los compuestos de oxidovanadio(IV) presentados en este trabajo, identificándose apoptosis como tipo de muerte celular inducido (Scalese, 2015).

#### 4.2.3 Actividad metabólica celular

Los experimentos de marcado con AV y IP revelaron que el compuesto Pt-dppf-mpo induce necrosis en parásitos tratados por 24 horas con concentraciones equivalentes a 10 veces el valor de IC<sub>50</sub> determinado, sin embargo, el porcentaje de células que permanecen sin teñir con los marcadores empleados es elevado (Figura 21). Para determinar si el compuesto afecta el metabolismo celular y la proliferación, los ensayos de tipo de muerte celular se complementaron con marcadores de viabilidad y vitalidad celular, como los son el IP y la calceína (CA), respectivamente. Las células vivas se distinguen por la presencia de la actividad esterasa intracelular, lo que produce en el control de parásitos sin tratar una intensa fluorescencia verde uniforme en las células, producida por la calceína.



**Figura 22.** Efecto del compuesto de platino sobre la vitalidad de epimastigotas de *T. cruzi*. La vitalidad y viabilidad celular fue evaluada usando CA e IP, respectivamente. Los parásitos fueron incubados con  $1x IC_{50}$  (línea gris),  $5x IC_{50}$  (patrón gris) y  $10x IC_{50}$  (patrón rayado) durante los tiempos indicados. Parásitos sin tratar fueron usados como control (línea negra). Todos los parásitos fueron analizados por citometría de flujo en un Accuri C6 (BD Bioscience) usando el software BD CSampler. Los histogramas muestran la intensidad de fluorescencia de los parásitos marcados correspondientes a uno de los dos experimentos realizados.

Al comenzar el tratamiento con el compuesto de platino, a diferentes concentraciones y tiempos de incubación, con  $1x IC_{50}$  se observa la misma intensidad de fluorescencia que en el control. Sin embargo, con  $5x$  y  $10x IC_{50}$  del compuesto se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia con respecto al control, es decir, se ve aumentada de la actividad esterasa celular (Figura 22). Para descartar que la intensidad de fluorescencia de CA del control sea el resultado de parásitos en malas condiciones, se realizó una tinción con IP, para comprobar la integridad de la membrana plasmática. No se observa una marcación positiva con IP cuando se incuban los parásitos con  $1x$  y  $5x IC_{50}$ , mientras que cuando se incuban los parásitos con concentraciones equivalentes a  $10x$  el valor  $IC_{50}$  calculado se observa un pequeño pico correspondiente al 10% de

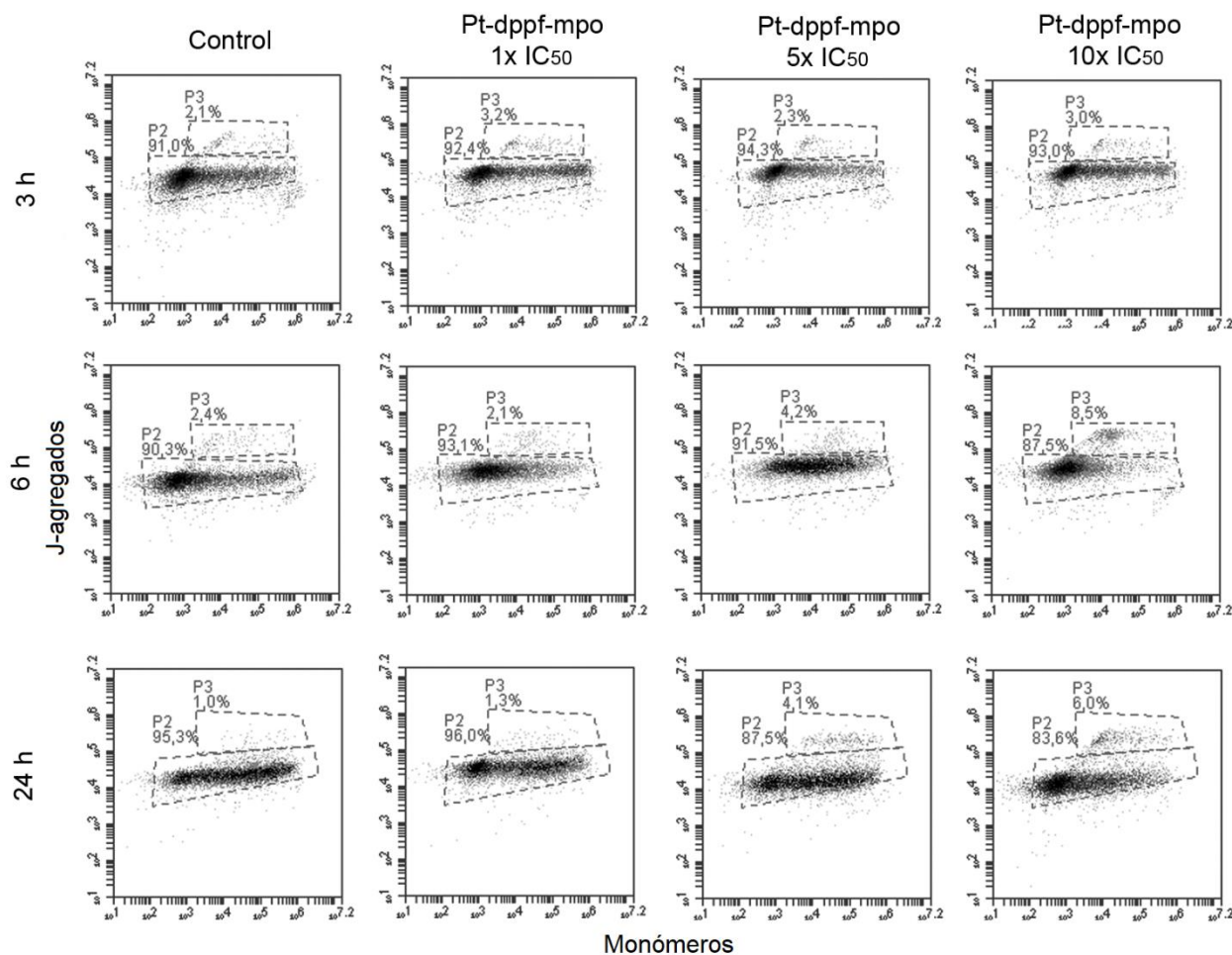
los parásitos necróticos observados en la Figura 21. Se descartaron así problemas de viabilidad celular intrínsecas en ausencia de compuesto.

El aumento en la actividad esterasa de los parásitos tratados con 5x y 10x IC<sub>50</sub> podría deberse potencialmente a mecanismos implicados en resistencia, dado el efecto hidrolítico que estas enzimas pueden ejercer sobre la estructura química de diferentes productos, incluyendo proteínas, lípidos, carbohidratos e incluso pequeños compuestos químicos (Montella, 2012). Por lo tanto, el aumento de la actividad esterasa de los parásitos tratados puede ser interpretado como una respuesta en defensa al compuesto metálico.

#### 4.2.4 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Un parámetro importante de la función mitocondrial que se utiliza como un indicador de la viabilidad de los parásitos es el potencial de membrana mitocondrial,  $\Delta\Psi_m$ . Para medir los cambios en el potencial de membrana inducidos por la incubación con el compuesto Pt-dppf-mpo se usó el colorante catiónico JC-1. Este colorante lipofílico puede entrar selectivamente en las mitocondrias exponiendo fluorescencia verde en su forma monomérica (~525 nm, FL1) o roja en su forma agregada (~590 nm, FL2). Estos J-agregados se producen con el aumento de potencial de la membrana mitocondrial. Por tanto, una fluorescencia roja indica mitocondrias sanas y fluorescencia verde indica que la función mitocondrial está afectada.

Luego del marcado con JC-1, se siguieron las poblaciones con membrana polarizada y despolarizada por citometría de flujo, luego del tratamiento con Pt-dppf-mpo y en poblaciones control sin tratar. Los resultados se muestran en la Figura 23.

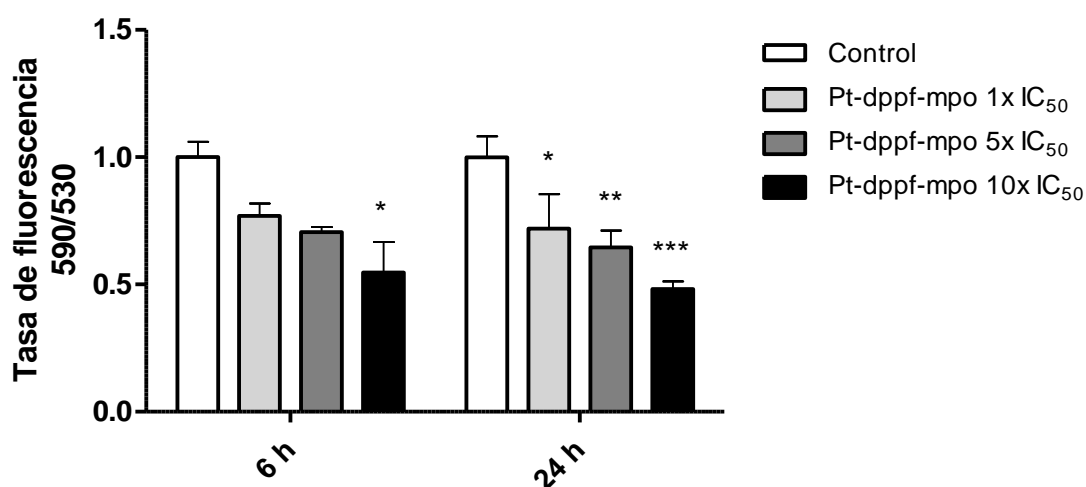


**Figura 23.** Efecto del compuesto Pt-dppf-mpo en el potencial de membrana mitocondrial. Se analiza mediante citometría de flujo la acumulación de JC-1 luego de los tiempos y las concentraciones de incubación señaladas. De acuerdo a las intensidades de fluorescencia roja y verde, se obtuvieron dos poblaciones de parásitos: con membrana no despolarizada (P2) y con membrana despolarizada (P3). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con resultados similares.

Como se observa en el tratamiento con el compuesto de platino, los parásitos control exhiben una fuerte coloración roja proveniente de los J-agregados (Figura 23, P2) y un bajo porcentaje de fluorescencia verde correspondiente a los monómeros (Figura 23, P3). En comparación, después del tratamiento con Pt-dppf-mpo exhiben un aumento de la fluorescencia verde, con una disminución de la fluorescencia roja lo cual indica que existe un daño en la función mitocondrial.

Para evaluar la disminución de intensidad de fluorescencia roja/verde que ocurre como consecuencia de la despolarización mitocondrial, se analizó la tasa de intensidad de fluorescencia 590/530 nm de parásitos tratados con diferentes concentraciones del compuesto de Pt en un lector de placas y se comparó con parásitos control. Esta disminución en la relación rojo/verde

fue cuantificada con respecto al control polarizado para determinar el decaimiento del  $\Delta\psi_m$  mitocondrial (Figura 24).



**Figura 24.** Tasa de intensidad de fluorescencia roja/verde (590/530) luego del tratamiento por 6 y 24 horas con 1x, 5x y 10x IC<sub>50</sub>. Parásitos sin tratamiento fueron usados como control. Las intensidades de fluorescencia a 590 y 530 nm fueron medidas en un lector de placas Varioskan Flash Spectral Scanning. Dos experimentos independientes fueron realizados, cada uno con tres réplicas técnicas (n = 6). Test de ANOVA: \* = P < 0.05, \*\* = P < 0.01, \*\*\* = P < 0,001.

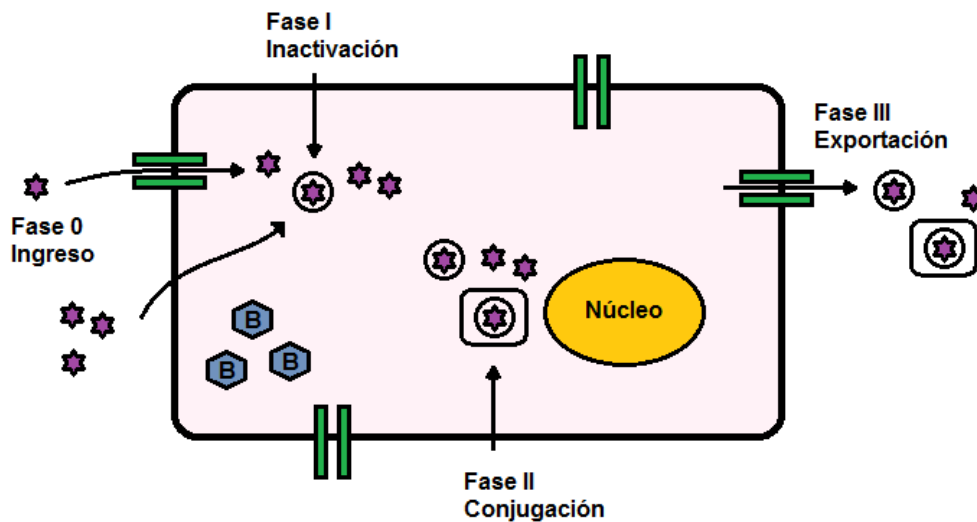
Los epimastigotas cultivados en presencia del compuesto, luego de 6 y 24 horas exhiben una tendencia en la disminución de la tasa de intensidad de fluorescencias roja/verde, indicando despolarización de la membrana de manera dependiente de la concentración (Figura 24). Luego de 6 horas de incubación la tasa de fluorescencia cae entre un 23 y un 55%, correspondiendo este último valor a 10x IC<sub>50</sub> y representando una disminución estadísticamente significativa. A las 24 horas, con 1 y 5x IC<sub>50</sub> de Pt-dppf-mpo, la tasa de fluorescencia se reduce entre un 28 y un 35%, respectivamente. Este efecto es más pronunciado a la mayor concentración empleada, de 10x IC<sub>50</sub>, cuando la tasa de fluorescencia de los parásitos tratados fue 2 veces menor comparado con los parásitos control (52%). Estos resultados son indicativos de un  $\Delta\psi_m$  mitocondrial comprometido.

Los cambios de  $\Delta\psi_m$  durante el tratamiento podrían indicar la generación de radicales libres que inducen estrés oxidativo, afectando el funcionamiento de la mitocondria. El  $\psi_m$  es crucial para la producción de ATP por la ATP sintasa, así como para el transporte de proteínas dentro de la mitocondria, por lo que las variaciones en este potencial pueden ser usadas como marcador de muerte celular programada en mamíferos y protozoos (Genes, 2011). Algunos autores sugieren que el tipo de muerte celular finalmente depende de la intensidad de la disfunción mitocondrial. Si la disfunción mitocondrial es masiva como para comprometer el

suministro de ATP de la célula, el resultado es necrosis, mientras que una forma más leve de disregulación mitocondrial da como resultado apoptosis (Kroemer, 1997; Zamzami, 1997). En este caso, las evidencias indican que se trata de una muerte celular mediante necrosis de forma dependiente de la mitocondria.

### 4.3 Análisis transcriptómico

Continuando con el análisis de la respuesta temprana del parásito frente al metalofármaco, para identificar genes y vías metabólicas participantes en su mecanismo de acción, se realizó un análisis del transcriptoma de parásitos incubados con  $5 \times IC_{50}$  durante 6 horas. Para este ensayo, se esperan encontrar expresados diferencialmente genes participantes en los mecanismos propuestos para la desintoxicación de fármacos (Figura 25). Entre ellos se encuentra la oxidación del fármaco entrante generalmente por acción de las proteínas con actividad redox (Fase I). Otro mecanismo consiste en la conjugación del fármaco o de su metabolito primario con enzimas de detoxificación (Fase II). Finalmente el eflujo del compuesto o sus metabolitos mediante transportadores completan los mecanismos de respuesta y eliminación de compuestos (Fase III) (Brandon, 2006).

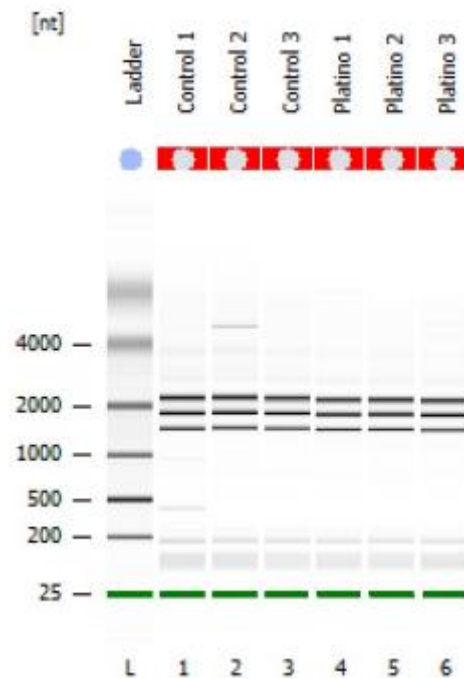


**Figura 25.** Esquema de las fases del metabolismo de agentes exógenos una vez ingresa a la célula. Se indican los principales mecanismos de detoxificación de fármacos empleados a nivel celular.

### 4.3.1 Calidad de las muestras

La calidad de las muestras de ARN es fundamental en el contexto de los análisis de expresión génica mediante RNA-Seq o PCR en tiempo real. 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). 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 que va desde el 1 al 10, se basa en la cuantificación de productos de degradación del ARN a lo largo de toda su migración electroforética, entre otras características. 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* estrictamente 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, a pesar de que los electroferogramas obtenidos mostraron un ARN de buena calidad a juzgar por la integridad de los ARNr (Figura 26), el valor RIN no correlaciona con los correspondientes electroferogramas (Ver 7.1 Bioanalyzer 2100 expert Eukaryote Total RNA Nano). El ARN extraído de cada muestra tuvo una concentración (600 ng/μL en promedio) e integridad adecuadas para superar el control de calidad y proceder a la secuenciación de fragmentos pareados en un secuenciador HiSeq2500.





**Figura 26.** Control de calidad de las muestras de ARN total extraídas, en un Agilent RNA 6000 Nano Chip, en un Agilent 2100 Bioanalyzer. Se observan las tres bandas correspondientes a los ARN ribosomales a la altura de 2000 pb.

### 4.3.2 Secuenciación

Luego de la secuenciación, se analizó el número total de bases leídas, número de lecturas, contenido en GC(%), y parámetros de calidad como el Q20(%), y Q30(%) para las 6 muestras correspondientes a parásitos control y a parásitos incubados con 5X IC<sub>50</sub> del compuesto metálico, ambos por triplicado. En la Tabla 4 se detallan los datos obtenidos para cada muestra. Es de destacar que todas las muestras superan el 97% de Q30 (99,9% de confianza en cada base), y que para cada uno de los triplicados se obtuvieron entre 14 y 18,5 millones de lecturas, lo cual es considerado muy adecuado para continuar los análisis.

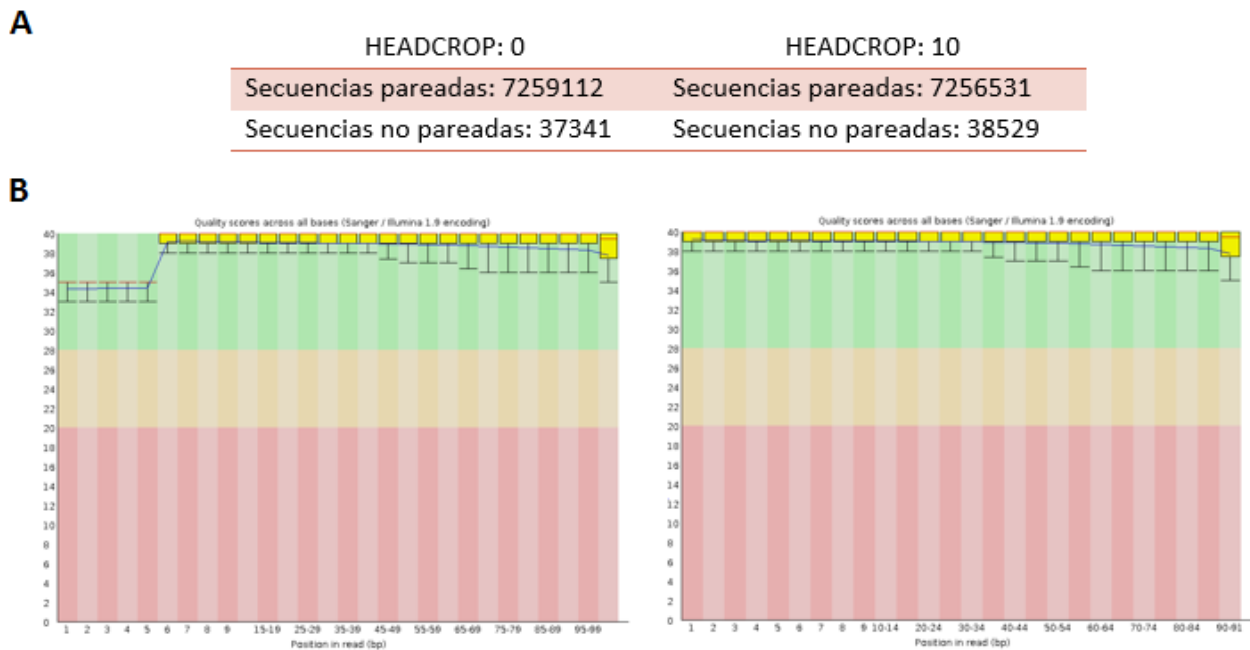
**Tabla 4.** Estadísticas de la secuenciación de las muestras control y tratadas con el metalofármaco de platino empleando un equipo HiSeq 2500.

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
CONTROL_1	1,474,252,964	14,596,564	52.720	47.28	98.669	97.490
CONTROL_2	1,510,067,968	14,951,168	52.586	47.41	98.676	97.502
CONTROL_3	1,847,368,376	18,290,776	52.269	47.73	98.665	97.485
PLATINO_1	1,710,276,632	16,933,432	52.934	47.07	98.676	97.498
PLATINO_2	1,543,141,226	15,278,626	52.673	47.33	98.732	97.605
PLATINO_3	1,680,652,120	16,640,120	52.439	47.56	98.738	97.618

- Sample ID : Sample name.
- Total read bases : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. In illumina paired-end sequencing, read1 and read2 are added
- GC(%) : GC content.
- AT(%) : AT content.
- Q20(%) : Ratio of reads that have phred quality score of over 20.
- Q30(%) : Ratio of reads that have phred quality score of over 30.

### 4.3.3 Calidad de las secuencias

En primera instancia se verificó la calidad de las secuencias crudas. Se separaron las lecturas pareadas de los que no presentaban su par complementario. Como se ejemplifica con el Control 1 en la Figura 27 A, del total de lecturas, más de 7 millones de lecturas presentan su lectura pareada y poco más de 37000 fueron descartadas por carecer de la misma. Para analizar la calidad de estas secuencias pareadas, se utilizó el programa FastQC Report, que aporta diversos gráficos relacionados a la calidad y características generales de las lecturas obtenidas. Siguiendo con el ejemplo para el Control 1, en la Figura 27 B se observa que las lecturas presentan en sus primeras bases una menor calidad que en el resto de la secuencia. Se procedió entonces al procesamiento donde se eliminan las bases de mala calidad de las lecturas obtenidas (*trimming* por calidad). Se empleó para ello el programa Trimmomatic-0.35 y se recortaron las primeras 10 bases. Luego de esto se volvieron a separar las lecturas pareadas de las no pareadas, quedando en esta última categoría poco más de 38000 lecturas (Figura 27, A), similar a lo obtenido para las secuencias sin recortar. Este procedimiento fue análogo para cada una de las secuencias.



**Figura 27. A.** Lecturas pareadas y no pareadas de la muestra CONTROL 1 antes (izquierda) y después (derecha) del procesamiento con el comando Headcrop: 10 con el programa Trimmomatic-0.35. **B.** Puntajes de calidad de cada una de las bases de la muestra CONTROL 1 de las lecturas antes (izquierda) y después (derecha) del procesamiento. La región verde indica los mejores valores de calidad, los cuales decrecen de amarillo a rojo.

Luego de procesadas las secuencias, se corrió nuevamente el FastQC Report para verificar la calidad de las secuencias procesadas (Anexo 7.2 Calidad de las secuencias de RNA-Seq). Este procesamiento generó algunos cambios en las características de las lecturas, pero mantuvo algunos parámetros importantes, por ejemplo, en el caso del puntaje de calidad por secuencia, éste continuó con su pico en 39 antes y después del proceso de *trimming* (Anexo 7.2 Calidad de las secuencias de RNA-Seq, Figura A1). Algunas características que se vieron modificadas fueron el contenido de secuencia por base y el contenido GC por base. Mientras en las primeras 10 bases se observa un alto contenido de C y fluctuaciones en el contenido de bases por posición, al avanzar en la lectura el contenido de bases se homogeniza. En las lecturas recortadas, el contenido de secuencia por base y el contenido GC presentan sólo leves fluctuaciones al comenzar la lectura (Anexo 7.2 Calidad de las secuencias de RNA-Seq, Figura A2). Finalmente, las últimas características reportadas por el FastQC fueron los niveles de duplicación por secuencia y el contenido de Kmeros. Si bien la mayoría de las secuencias presentan una sola copia, también pueden observarse muchas secuencias con entre 2-4 duplicados y más de 10 (Anexo 7.2 Calidad de las secuencias de RNA-Seq, Figura A3), incluso después del procesamiento. Esto se debe a que el genoma de *T. cruzi* presenta más de un 50% de secuencias repetidas como ser retrotransposones y familias de moléculas de superficie, que incluyen trans-sialidasas, mucinas,

metaloproteasas y proteínas MASP (El-Sayed, 2005a). Por su parte, el contenido de Kmeros en las primeras 10 bases presenta un enriquecimiento relativo muy fluctuante, que se vio disminuido al eliminar esas bases (Anexo 7.2 Calidad de las secuencias de RNA-Seq, Figura A3).

#### 4.3.4 Mapeo de las secuencias

Una vez procesadas las lecturas se procedió a su mapeo sobre la referencia genómica. Los pasos de mapeo fueron realizados utilizando el programa Bowtie2 con la opción `--very-sensitive`. Usando como referencia el genoma unido de las últimas versiones de los haplotipos Esmeraldo-Like y Non-Esmeraldo-Like descargados de la base de datos TriTrypDB, se obtuvo un excelente porcentaje general de alineamiento, el cual superó el 91% para todas las muestras.

#### 4.3.5 Conteo de secuencias

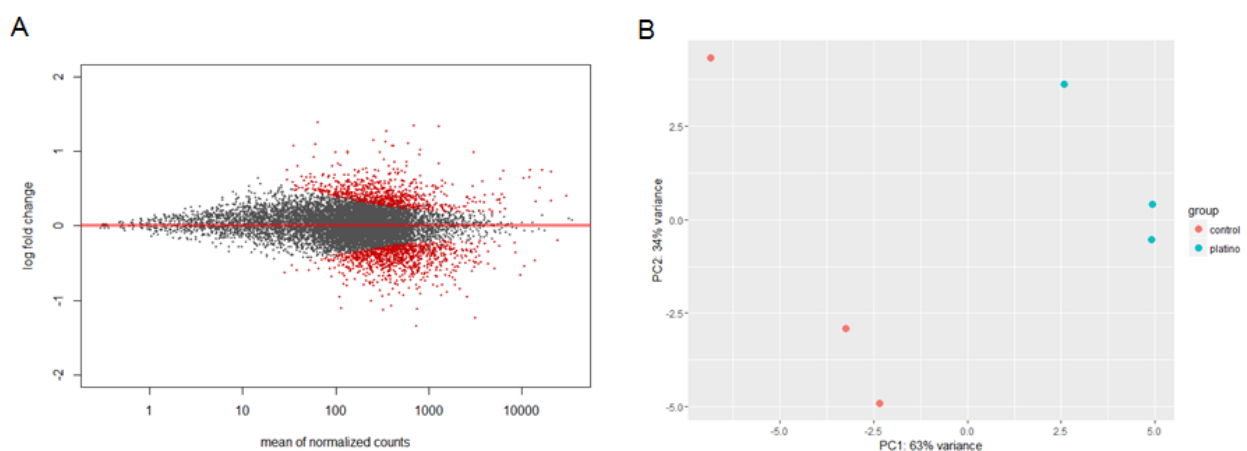
A continuación se utilizó el programa HTSeq-count v0.6.1p2, que permite contar cuántas lecturas mapearon sobre cada gen usando como entrada el mapeo generado por Bowtie2 y el archivo de anotación del genoma, en este caso correspondiente al haplotipo Non-Esmeraldo, el cual fue obtenido de la base de datos TriTrypDB. Se contabilizaron entre un 47 y un 53% de lecturas mapeadas en regiones codificantes (CDS), quedando el resto de las lecturas en regiones no codificantes. Las lecturas alineadas sobre estas últimas, podrían estar mapeando sobre regiones 5' o 3' UTR por lo que no fueron contabilizadas en análisis posteriores, así como tampoco las lecturas sin alinear o con un alineamiento ambiguo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Conteo de las lecturas mapeadas al genoma de referencia CL Brener, haplotipo Non-Esmeraldo.

	Control 1	Control 2	Control 3	Platino 1	Platino 2	Platino 3
Lecturas totales	7256531	7424503	9061771	8109746	7749316	8933200
Alineado sobre CDS	3573393	3642393	4437000	3837820	3903340	4717746
Alineado sobre no CDS	3255487	3330750	4089474	3752853	3383049	3691843
Ambiguas	21288	23641	31780	26038	21963	28069
Baja calidad	0	0	0	0	0	0
No alineadas	406363	427719	503517	493035	440964	495542
% lecturas en CDS	49,2	49,1	49,0	47,3	50,4	52,8

### 4.3.6 Análisis de expresión diferencial

Para identificar los genes expresados diferencialmente entre las muestras control y los parásitos incubados con el compuesto, se empleó el programa DESeq2, el cual calcula los factores de normalización para ajustar las distintas réplicas y condiciones para que las mismas se vuelvan comparables. En la Figura 28 A se muestra un gráfico de puntos que representa para cada gen el  $\log_2FC$  y la media de conteos normalizados (MA plot) para una de las muestras, así como también análisis de componentes principales que permite ver la distancias relativas entre las distribuciones de las diferentes muestras (PCA) (Figura 28 B).



**Figura 28. A.** Gráfico MA de la media de conteos normalizados en función del  $\log_2FC$  luego del tratamiento de 5x IC<sub>50</sub> durante 6 horas con el compuesto de platino, donde los puntos rojos representan los genes con FDR menor a 0,1 para la diferencia entre el tratamiento y el control. **B.** Análisis de componentes principales de las muestras tratadas (puntos azules) y no tratadas (puntos rojos) con el compuesto de platino.

Se extrae como primera conclusión del análisis, que si bien hay genes diferencialmente expresados con el criterio de un valor de FDR menor a 0,1, la magnitud de los cambios de expresión con respecto al control son pequeños. En cuanto a las réplicas biológicas, el análisis de componentes principales revela que las muestras control se agrupan preferentemente entre ellas y las muestras tratadas con el compuesto de platino se agrupan aparte, confirmando que se trata de diferentes poblaciones.

Para el análisis posterior se definieron como genes diferencialmente expresados (DE) los genes que cumplen con un valor de FDR menor a 0,01 entre las muestras control y tratadas y un  $\log_2 FC$  de  $[0,5]$ , excluyendo pseudogenes. De esta manera se identificaron un total de 150 genes sobre-expresados y 218 sub-expresados de un total de 10960 genes analizados.

### 4.3.7 Análisis de los genes regulados

Los primeros 50 genes de cada lista de genes sobre y sub-expresados luego del tratamiento se enumeran en las Tabla 6 y Tabla 7; las listas completas se encuentran en los Anexos 7.3 Lista de genes sobre-expresados ( $\log_2 FC > 0,5$ ;  $FDR < 0,01$ ) y 7.4 Lista de genes sub-expresados ( $\log_2 FC < -0,5$ ;  $FDR < 0,01$ ). En líneas generales, se identificaron genes cuyas proteínas tienen funciones relacionadas a procesos de desintoxicación, transporte, proteínas de unión a ARN, quinasas, fosfatasa y oxido-reductasas.

**Tabla 6.** Lista de los 50 genes más sobre-expresados luego del tratamiento con el compuesto de platino. Se detalla la identidad del gen (ID), el valor de  $\log_2 FC$ , FDR y la descripción de la proteína codificada por dicho gen.

Gen ID	$\log_2 FC$	FDR	Descripción
TcCLB.506275.121	1,39	2,24E-10	hypothetical protein
TcCLB.509161.10	1,27	2,86E-23	ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative
TcCLB.510581.20	1,16	7,96E-15	receptor-type adenylate cyclase, putative
TcCLB.507063.70	1,14	8,99E-20	trans-sialidase, Group II, putative
TcCLB.503583.100	1,10	1,49E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506009.10	1,08	7,87E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511635.80	1,03	2,25E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506479.120	1,00	2,09E-08	cytidine triphosphate synthase, putative
TcCLB.508857.30	0,99	1,39E-14	trans-sialidase, Group I, putative
TcCLB.507515.100	0,99	8,81E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508859.118	0,98	7,46E-08	trans-sialidase, putative
TcCLB.506193.60	0,96	1,74E-22	ascorbate peroxidase, putative
TcCLB.511653.20	0,92	5,33E-05	dual-specificity protein phosphatase, putative
TcCLB.508799.270	0,84	3,74E-22	protein associated with differentiation 4, putative
TcCLB.508065.70	0,84	2,24E-05	protein associated with differentiation 8, putative
TcCLB.510729.140	0,82	4,74E-05	NIMA-related kinase, putative
TcCLB.510305.70	0,81	1,78E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506721.30	0,81	1,79E-08	calpain-like cysteine peptidase, putative
TcCLB.508669.10	0,80	1,02E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506241.80	0,78	6,80E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508153.560	0,77	9,08E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511465.20	0,76	2,81E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509105.140	0,75	6,76E-26	heat shock protein 85, putative
TcCLB.510223.9	0,75	4,98E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509105.150	0,75	4,90E-28	heat shock protein 85, putative
TcCLB.510333.10	0,75	6,81E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511907.89	0,75	1,49E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.510575.210	0,74	6,69E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509643.139	0,74	4,29E-23	Heat shock protein 83, putative
TcCLB.510335.10	0,74	1,49E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.504109.30	0,74	2,11E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509643.130	0,73	3,62E-26	heat shock protein 85, putative
TcCLB.511291.50	0,72	2,43E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511269.40	0,72	2,71E-05	cAMP phosphodiesterase A, putative
TcCLB.505183.130	0,72	4,26E-09	sugar transporter, putative

TcCLB.508661.70	0,72	2,30E-08	Enriched in surface-labeled proteome protein 18
TcCLB.508857.130	0,72	4,65E-11	hypothetical protein, conserved
TcCLB.504021.10	0,71	3,08E-06	G1 cyclin CycE4, putative
TcCLB.511565.30	0,70	4,69E-03	mucin TcMUCII, putative
TcCLB.508175.200	0,70	8,97E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509287.80	0,70	4,27E-08	trans-sialidase, Group VII, putative
TcCLB.503411.30	0,69	1,78E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506679.80	0,69	2,05E-04	SNF1-related protein kinases, putative
TcCLB.508797.10	0,69	3,31E-04	tubulin-tyrosine ligase-like protein, putative
TcCLB.506439.9	0,68	7,49E-05	myosin heavy chain, putative
TcCLB.503559.70	0,68	2,31E-06	cystinosin, putative
TcCLB.507073.20	0,67	3,75E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511821.179	0,66	8,26E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509605.20	0,66	5,35E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509713.30	0,65	5,25E-21	hypothetical protein, conserved

Luego del tratamiento con el compuesto de platino, se observa un aumento en la expresión de proteínas de superficie como las trans-sialidasas y mucinas, proteínas de respuesta a estrés como las *heat shock*, genes que codifican para proteínas transportadoras, como los transportadores del tipo ABC, responsables del tráfico celular, además de quinasas e intermediarios de metabolitos secundarios que participan en diversas vías de señalización celular.

Entre los genes implicados en el transporte, los transportadores ABC (Zingales, 2015), se han relacionado con la respuesta a fármacos en *T. cruzi*, particularmente con mecanismos de resistencia (García-Huertas, 2017). En esos casos estos genes se encuentran sobre-expresados ya que conducen finalmente a la resistencia a fármacos aumentando el eflujo de fármaco de la célula, disminuyendo así la concentración efectiva de fármaco intracelular (Sauvage, 2009).

Debido a la naturaleza de las proteínas quinasas y fosfatasa, que regulan varias actividades celulares incluyendo proliferación, supervivencia, apoptosis, metabolismo, transcripción y diferenciación (Wu, 2015), estas proteínas podrían regular otros procesos celulares involucrados en el desarrollo de la respuesta frente a los fármacos.

**Tabla 7.** Lista de los 50 genes más sub-expresados luego del tratamiento con el compuesto de platino. Se detalla la identidad del gen (ID), el valor de  $\log_2FC$ , FDR y la descripción de la proteína codificada por dicho gen.

Gen ID	$\log_2FC$	FDR	Descripción
TcCLB.510947.50	-1,34	8,66E-44	cyclophilin, putative
TcCLB.511899.40	-1,23	5,17E-55	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative
TcCLB.507913.20	-1,12	9,91E-18	phosphomevalonate kinase protein, putative
TcCLB.511899.10	-1,12	7,37E-27	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative
TcCLB.507057.40	-1,10	4,39E-09	hypothetical protein, conserved

TcCLB.507583.20	-1,07	3,81E-19	nucleolar protein, putative
TcCLB.506627.100	-1,00	1,22E-11	hypothetical protein, conserved
TcCLB.503925.80	-0,95	3,71E-07	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
TcCLB.505183.30	-0,95	3,18E-29	malic enzyme, putative
TcCLB.509253.30	-0,94	2,90E-13	3-Beta-hydroxysteroid-delta(8), delta(7)-isomerase
TcCLB.509715.40	-0,93	1,44E-17	fibrillarlin, putative
TcCLB.504839.50	-0,92	2,39E-18	nucleosome assembly protein-like protein, putative
TcCLB.506821.110	-0,91	5,18E-14	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509105.90	-0,91	1,31E-17	MRB1-associated protein, putative
TcCLB.509793.40	-0,90	1,30E-15	kinetoplast-associated protein
TcCLB.511025.70	-0,89	1,53E-20	chaperonin alpha subunit, putative
TcCLB.506195.300	-0,84	4,96E-15	deoxyhypusine synthase, putative
TcCLB.508593.110	-0,84	3,90E-12	arginine N-methyltransferase, putative
TcCLB.507649.70	-0,84	1,38E-22	nucleolar RNA-binding protein, putative
TcCLB.511367.138	-0,83	1,39E-14	chaperone DNAJ protein, putative
TcCLB.510445.50	-0,82	1,32E-16	S-adenosylmethionine synthetase, putative
TcCLB.508173.40	-0,80	9,58E-17	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
TcCLB.510687.120	-0,80	1,18E-07	snoRNP protein GAR1, putative
TcCLB.511491.70	-0,79	5,29E-18	endosomal integral membrane protein, putative
TcCLB.508269.60	-0,79	1,07E-06	exosome-associated protein 4, putative
TcCLB.510943.50	-0,79	2,98E-20	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
TcCLB.508971.30	-0,79	1,77E-19	lysyl-tRNA synthetase, putative
TcCLB.508173.180	-0,78	1,79E-11	mRNA transport regulator MTR2, putative
TcCLB.511281.40	-0,78	3,37E-15	mevalonate-diphosphate decarboxylase, putative
TcCLB.511283.124	-0,78	6,50E-11	mitochondrial carrier protein, putative
TcCLB.503809.120	-0,78	2,75E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508641.184	-0,77	1,80E-07	Eukaryotic translation initiation factor 1, putative
TcCLB.510153.19	-0,76	2,63E-10	tricarboxylate carrier, putative
TcCLB.510657.90	-0,76	9,10E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511033.20	-0,76	7,35E-07	hypothetical protein
TcCLB.508153.820	-0,75	4,57E-07	inorganic pyrophosphatase, putative
TcCLB.510901.10	-0,75	4,11E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511287.150	-0,75	1,26E-09	fibrillarlin, putative
TcCLB.508355.160	-0,75	1,13E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511367.60	-0,74	1,79E-14	Lupus La protein homolog, putative
TcCLB.506201.154	-0,73	1,90E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509795.30	-0,73	3,06E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511287.90	-0,73	1,91E-10	ribosome biogenesis protein, putative
TcCLB.510001.10	-0,73	1,38E-09	hypothetical Zinc-finger containing protein
TcCLB.511383.40	-0,72	6,85E-08	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
TcCLB.509693.80	-0,72	1,87E-06	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative
TcCLB.511725.250	-0,72	1,28E-14	chaperonin containing t-complex protein, putative
TcCLB.507765.130	-0,72	2,25E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509261.30	-0,72	1,13E-10	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor
TcCLB.508707.227	-0,72	1,34E-04	ATP binding protein-like protein, putative

El transcrito que resulta más disminuido en su expresión como resultado del tratamiento con el compuesto de platino, es el gen que codifica para la ciclofilina. Esta proteína está implicada en la respuesta al estrés oxidativo y se ha reportado que dicho gen se encuentra

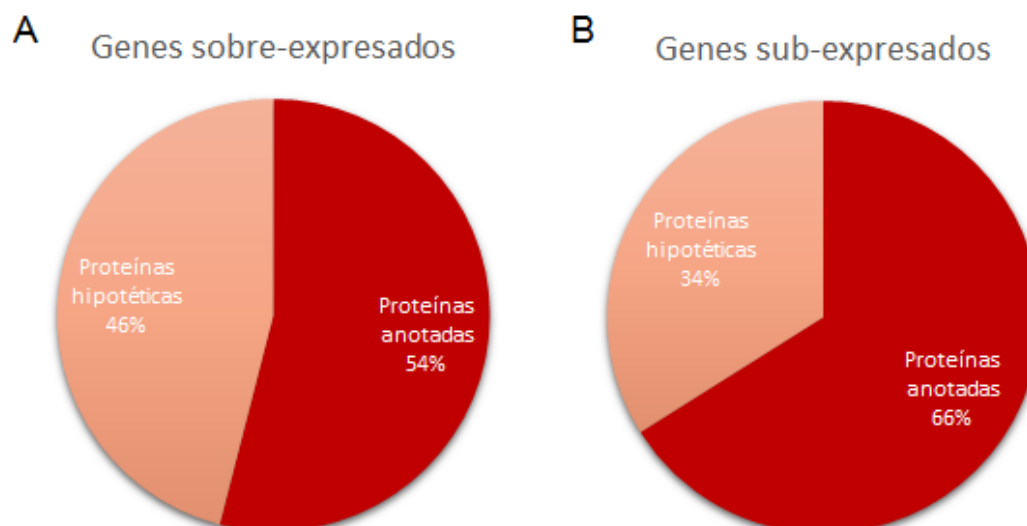


regulado positivamente en parásitos resistentes a fármacos como Benznidazol (Andrade, 2008; Garcia-Huertas, 2017; Rego, 2015). Se ha propuesto además, que esta proteína puede contribuir a contrarrestar el estímulo del estrés químico a través de mecanismos tales como el aumento de la actividad de plegado de la proteína, que es necesaria para la expresión eficiente de polipéptidos funcionales (Garcia-Huertas, 2017). Por lo tanto, la deficiencia en esta actividad puede conducir a la muerte celular.

El tratamiento con el compuesto de platino provoca la disminución de la expresión de otros tipos de genes, que codifican para proteínas chaperonas, enzimas oxido-reductasas y proteínas de unión al ARN. Las oxido-reductasas son una clase de enzimas que están implicadas en los mecanismos de respuesta y resistencia, ya que participan en la oxidación del fármaco entrante. Pero también se han asociado con la activación de fármacos, generando metabolitos tóxicos, como especies reactivas de oxígeno, que causan la muerte de los parásitos (Hall, 2010; Mejia-Jaramillo, 2011).

Por su parte, las proteínas de unión a ARN, regulan la localización y estabilidad del ARNm, movilizándolo a los ribosomas para su traducción o potenciando la deadenilación y posterior degradación de mRNAs o reprimiendo la iniciación de la traducción en células eucariotas (Wharton, 2006). Los efectos de su sub-expresión podrían tener un potencial impacto a nivel de las proteínas sintetizadas en los parásitos tratados.

Por otra parte, el genoma de *T. cruzi* se caracteriza por el alto porcentaje de proteínas hipotéticas y de función desconocida, por lo que el primer análisis se basó en determinar cuántos de los genes regulados estaban anotados y tenían una función conocida en este parásito (Figura 29).



**Figura 29.** Porcentaje de proteínas hipotéticas y anotadas correspondientes a los genes sobre-expresados. **A.** y sub-expresados. **B.** luego del tratamiento con el compuesto de platino.

El porcentaje de proteínas anotadas como proteínas hipotéticas varía entre un 34 y un 46%. Las proteínas hipotéticas constituyen casi la mitad de las proteínas anotadas en el genoma de *T. cruzi*, lo cual constituye una dificultad a la hora de realizar análisis masivos dado que gran parte de los genes regulados no tienen una función asignada y por lo tanto no se pueden correlacionar con el fenotipo en estudio (Andrade, 2008; Atwood, 2005; Silber, 2012). Esto demuestra la necesidad que existe de caracterizar las proteínas hipotéticas de *T. cruzi* para asignar una función e identificar, no sólo los genes implicados en el mecanismo de acción de los medicamentos, sino en los diferentes procesos moleculares del parásito, que aún permanecen inexplorados. Son precisamente los procesos específicos de *T. cruzi* los blancos moleculares deseables de cualquier nueva terapia contra la enfermedad de Chagas, de manera de generar tratamientos efectivos con el menor efecto posible sobre el hospedero mamífero.

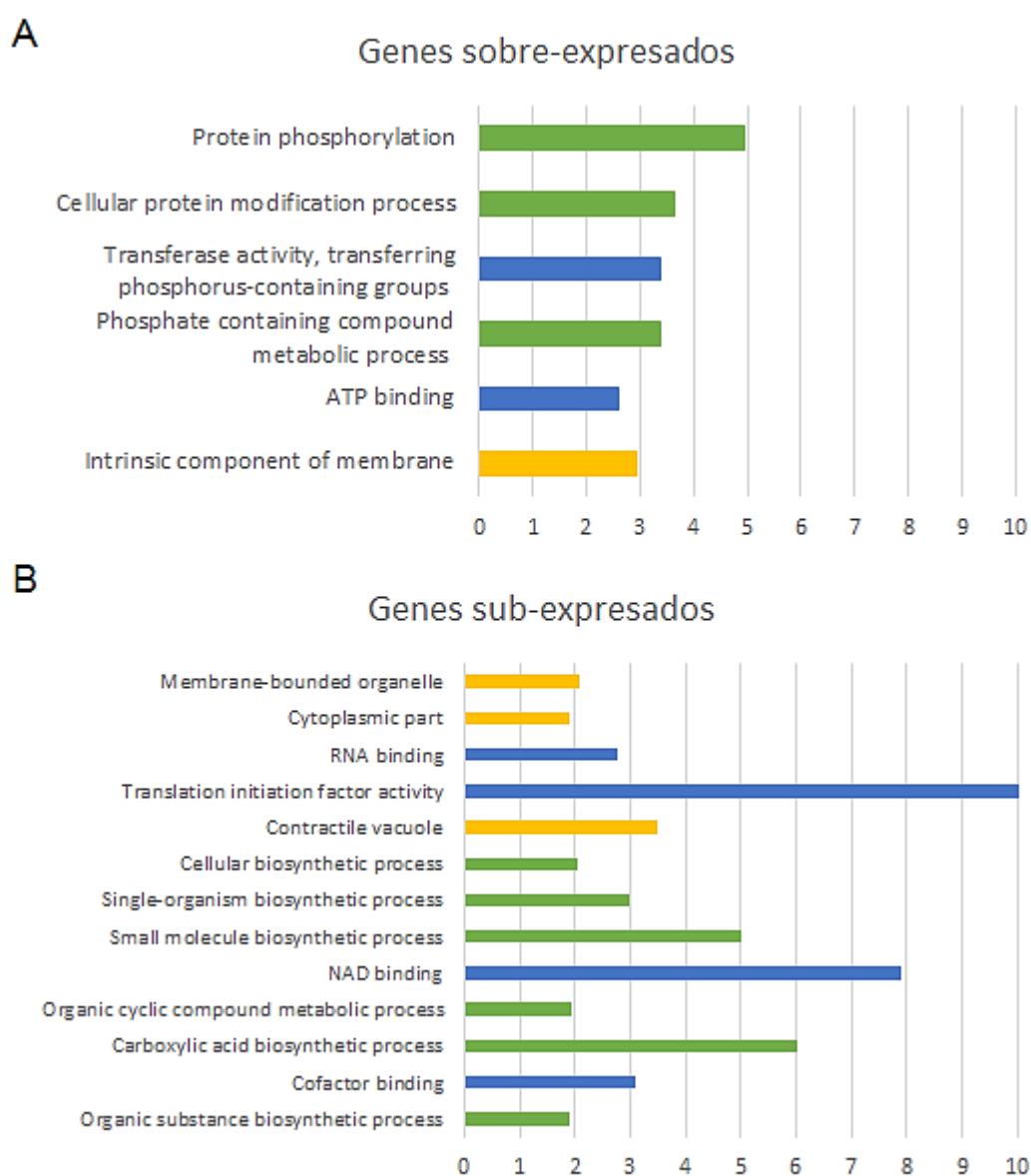
#### 4.3.8 Análisis de ontología génica, clases enzimáticas y vías metabólicas

La ontología de genes (GO) representa términos de funciones relacionadas entre sí de manera ordenada, las cuales tienen como objetivo describir la función 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 se encuentran involucrados.

Existen múltiples herramientas desarrolladas para el análisis de listas de genes expresados diferencialmente, entre ellas Blast2GO y la base de datos TriTrypDB y otros como DAVID (Huang

da, 2009) o GSEA (Subramanian, 2005). Estas herramientas han sido desarrolladas para organismos cuyo genoma sea conocido y posea una anotación en términos GO.

Usando la base de datos TriTrypDB, se analizaron los genes de cada lista y se obtuvieron los términos GO más enriquecidos con una estadística que superara un valor de Bonferroni  $< 0,05$ . A pesar de la cantidad de genes en estudio, no siempre fue posible obtener diversos términos de GO enriquecidos para cada ontología con una estadística satisfactoria, lo cual puede deberse al alto porcentaje de proteínas hipotéticas con función desconocida halladas. En este caso, la redundancia de la base de datos aportó muchos resultados idénticos en categorías que eran incluidas a su vez en categorías menos específicas. Por este motivo, todos los términos obtenidos fueron curados comparando los genes incluidos en cada término GO, de manera que no se superpongan, y así se determinaron los términos con mejor significancia estadística. Para el caso de los genes sobre y sub-expresados luego del tratamiento, los términos de GO más representados se encuentran en la Figura 30. Los genes que componen cada término pueden ser consultados en los Anexos 7.5 Lista de términos GO de genes sobre-expresados y 7.6 Lista de términos GO de genes sub-expresados.

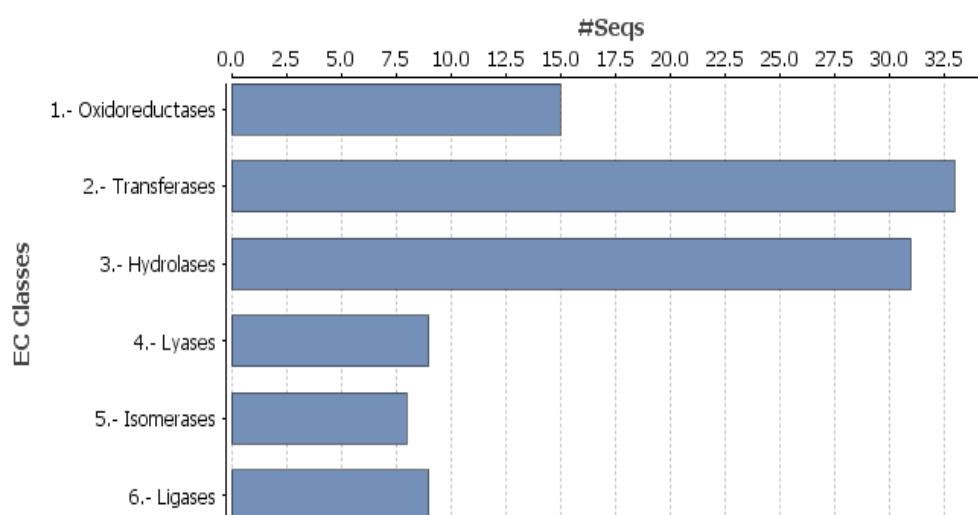


**Figura 30.** Enriquecimiento de los términos de GO de los genes diferencialmente expresados luego del tratamiento con platino. Los genes se muestran ordenados según su valor de Bonferroni, siempre menor a 0,05. **A.** Genes sobre-expresados. **B.** Genes sub-expresados. Verde: procesos biológicos; azul: función molecular; amarillo: componente celular.

En rasgos generales se observa que en los genes sobre-expresados se encuentran representados menos términos que en los genes sub-expresados, y que entre ellos están muy relacionados entre sí. Los términos de GO, luego del tratamiento con el compuesto de platino, se encuentran dentro de los procesos biológicos de modificación de proteínas, fuertemente asociados a compuestos forforilados. Relacionado a esto, se encuentran procesos moleculares de fosfotransferencia y de unión a ATP. Los componentes intrínsecos de membrana aparecen dentro de los componentes celulares representados. Por su parte, los genes sub-expresados involucran organelos rodeados por membrana, como ser vacuolas contráctiles, el término que se encuentra

enriquecido. Los principales procesos biológicos modificados son los biosintéticos de pequeñas moléculas, como pueden ser distintos precursores, así como también sustancias orgánicas, como compuestos cíclicos y ácidos carboxílicos. Finalmente, los genes que codifican para proteínas de unión a ARN y de factores de iniciación de la traducción, y genes que codifican para proteínas de unión a cofactores como el NAD también se encuentran a la baja.

Empleando la herramienta de Blast2GO (Götz, 2008) que permite estudiar la distribución de las enzimas, se determinó que clases de enzimas eran las afectadas por el tratamiento (Figura 31). Para este estudio se analizaron todos los genes DE, dado que la actividad aumentada o disminuida de una enzima puede retroalimentar positiva o negativamente una vía metabólica, dependiendo de la vía y de la ubicación de la enzima en la misma. Por este motivo no hay una linealidad clara entre la expresión y la modulación de la vía y todos los genes modificados fueron analizados en conjunto.



**Figura 31.** Principales clases de enzimas encontradas en los genes con expresión diferencial en los parásitos tratados con el compuesto de platino. El histograma representa los resultados obtenidos por el programa Blast2GO.

Dentro de los genes diferencialmente expresados, se encuentran diferentes clases de enzimas muy representadas, como las hidrolasas, transferasas y oxidorreductasas. Por su parte, las hidrolasas, enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de un enlace químico, pertenecen a la familia de las esterasas. Este tipo enzimático, reportado con su actividad aumentada mediante el ensayo con calceína al estudiar metabolismo celular de los parásitos tratados (Figura 22), es confirmado mediante este ensayo con su metabolismo alterado. Por su parte, tanto las esterasas como las oxidorreductasas median las reacciones principales de la Fase I del metabolismo de

compuestos, las cuales generan modificaciones químicas que aumentan la solubilidad de un compuesto pero además pueden transformarlo en profármaco, potenciar o disminuir su actividad o inactivarlo. Finalmente, las transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional, por ejemplo un metilo o un grupo fosfato, de una molécula donadora a otra aceptora, constituyendo los principales tipos de modificaciones obtenidas en la Fase II del metabolismo de sustancias exógenas.

Con todos los genes DE también se analizaron las vías metabólicas afectadas luego del tratamiento usando la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), con un valor de Bonferroni  $< 0,05$ . Las vías afectadas con significancia estadística (Bonferroni  $< 0,05$ ) se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Vías metabólicas afectadas determinadas usando la base de datos KEGG luego del tratamiento con el compuesto de platino.

ID	Nombre	Porcentaje de genes	Enriquecimiento	Bonferroni
ec00270	Cysteine and methionine metabolism	20,5	4,6	5,1E-05
ec00981	Insect hormone biosynthesis	21,8	4,9	7,7E-04
ec00624	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	21,2	4,7	2,3E-03
ec01057	Biosynthesis of type II polyketide products	15,6	3,5	4,2E-03
ec00363	Bisphenol degradation	28	6,2	1,4E-02
ec00253	Tetracycline biosynthesis	16,7	3,7	1,5E-02
ec00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	14,8	3,3	2,1E-02
ec00966	Glucosinolate biosynthesis	41,7	9,3	2,5E-02
ec00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism	16,9	3,8	2,6E-02

Luego del tratamiento con el compuesto de platino, se modifican vías relacionadas al metabolismo de los aminoácidos sulfurados cisteína y metionina. El resto de los términos obtenidos no ha podido ser correlacionado directamente con el fenotipo observado.

En las listas analizadas se encontraron genes con funciones relevantes en la respuesta al compuesto y para la sobrevivencia del parásito. La presencia y el efecto del compuesto metálico deben ser sentidos para activar respuestas adaptativas que contrarresten la acción del mismo, lo que explicaría el aumento en la expresión de intermediarios de vías de señalización, como el receptor de adenilato ciclasa y la cAMP fosfodiesterasa, entre otros participantes de vías de transducción de señales. Entre ellos se encuentran la fosfatasa de especificidad dual y la CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatidiltransferasa. Esta última genera, a partir de CDP-diacilglicerol e inositol, el fosfatidil-inositol, el cual en su forma fosforilada funciona como segundo mensajero

celular. La ruta del fosfatidil-inositol es interesante, ya que está implicada en la supervivencia del parásito mediante el control de la osmorregulación, el transporte a través de las membranas y la activación de diversos factores de transcripción (Velasquez, 2015).

Las enzimas que participan del proceso de ubiquitinación, que degradan proteínas vía proteosoma por diversas razones, entre ellas el mal plegamiento, también se encuentran aumentadas en su expresión en parásitos incubados con el compuesto de platino. Relacionado a esto se ven además aumentadas en su expresión proteínas de respuesta a estrés que se unen a proteínas mal plegadas como son las proteínas de choque térmico o *heat shock*. Estas proteínas sirven como chaperonas moleculares que ayudan a los polipéptidos nacientes evitando el mal plegamiento (Pizarro, 2013). Esto podría representar una respuesta celular frente a procesos de traducción con productos proteicos deficientes o proteínas afectadas por acción directa del compuesto metálico. Además, la ciclofilina también aumenta la actividad de plegado de las proteínas, por lo que la disminución de este gen puede jugar un rol fundamental en la muerte celular, dada la importancia de su función para obtener proteínas funcionales (García-Huertas, 2017).

También aparecen disminuidos en su expresión, transcritos que codifican para proteínas que participan en vías metabólicas, como la mediada por la proteína quinasa de fosfomevalonato. Esta enzima participa en la vía de biosíntesis del ergosterol, un producto alternativo al colesterol de mamíferos, y podría explicar, al menos en parte, los cambios morfológicos observados mediante microscopía en el presente trabajo, ya que fenómenos similares se han reportado con inhibidores de la vía del ergosterol (Veiga-Santos, 2012).

Por su parte, proteínas de unión a ARN, como la proteína asociada a MRB1 y factores de inicio de la traducción, como el factor 4 gamma 3, se encuentran disminuidos en su expresión, con todas las implicancias a nivel de estabilidad de mensajero y traducción de proteínas que pueden involucrar. Finalmente, también aparecen disminuidos en su expresión, transcritos que codifican para proteínas de oxidación-reducción que unen el cofactor NAD, lo cual había sido observado por nuestro grupo en trabajos previos con extractos proteicos totales de *T. cruzi* luego del tratamiento (Rodríguez Arce, 2015).

#### 4.4 PCR en tiempo real

Para confirmar los genes relacionados con la respuesta al compuesto, se seleccionaron 11 transcriptos cuya expresión es modulada como consecuencia de la incubación de parásitos con el compuesto de platino y se sintetizaron cebadores específicos para cada uno de ellos. Se diseñaron además cebadores específicos para un gen que codifica para la citocromo P450 (TcCLB.510657.170) que no presenta diferencias de expresión entre parásitos tratados y control a nivel de transcriptoma y para el gen de la treonil-tRNA sintetasa, el gen que se empleó como normalizador.

Previo a los ensayos de validación de los resultados del transcriptoma, se analizaron las eficiencias de amplificación de cada uno de los cebadores empleados a partir de la pendiente del gráfico de los valores de amplificación  $C_T$  en función del logaritmo del valor de concentración las muestras obtenidas por diluciones seriadas (Ver 7.7 Curvas de eficiencia y de *melting* de los cebadores de RT-PCR). Para todos los cebadores se obtuvieron valores de eficiencia similares, con menos de un 10% de diferencia entre la eficiencia de cada par y del par de la treonil-tRNA sintetasa, el gen que se usó como normalizador de las RT-PCR, por lo que se procedió a trabajar con todos ellos sin descartar ningún par (Tabla 9).

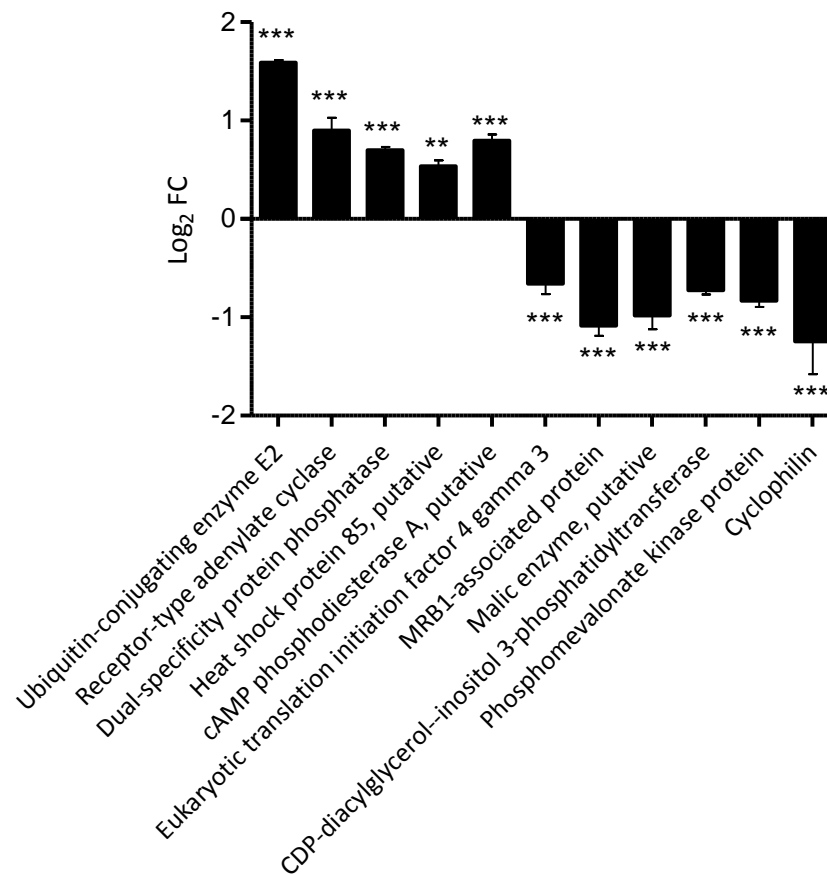
**Tabla 9.** Eficiencia de los cebadores empleados para las reacciones de RT-PCR.

ID	Descripción	Eficiencia (%)
TcCLB.510581.20	receptor-type adenylate cyclase, putative	111,8
TcCLB.511653.20	dual-specificity protein phosphatase, putative	109,2
TcCLB.507913.20	phosphomevalonate kinase protein, putative	113,6
TcCLB.510947.50	cyclophilin, putative	110,2
TcCLB.509105.90	MRB1-associated protein, putative	108,7
TcCLB.503925.80	CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase	104,4
TcCLB.509161.10	ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative	105,4
TcCLB.511269.40	cAMP phosphodiesterase A, putative	104,9
TcCLB.509105.140	heat shock protein 85, putative	109,2
TcCLB.511383.40	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	119,5
TcCLB.505183.30	malic enzyme, putative	104,0
TcCLB.510657.170	cytochrome P450 reductase, putative	107,4
TcCLB.508299.80	threonyl-tRNA synthetase, putative	112,6

Se analizó además para cada reacción las curvas de *melting* obtenidas y se constató la presencia de un solo pico correspondiente a un solo producto de amplificación por reacción (Ver 7.7 Curvas de eficiencia y de *melting* de los cebadores de RT-PCR).

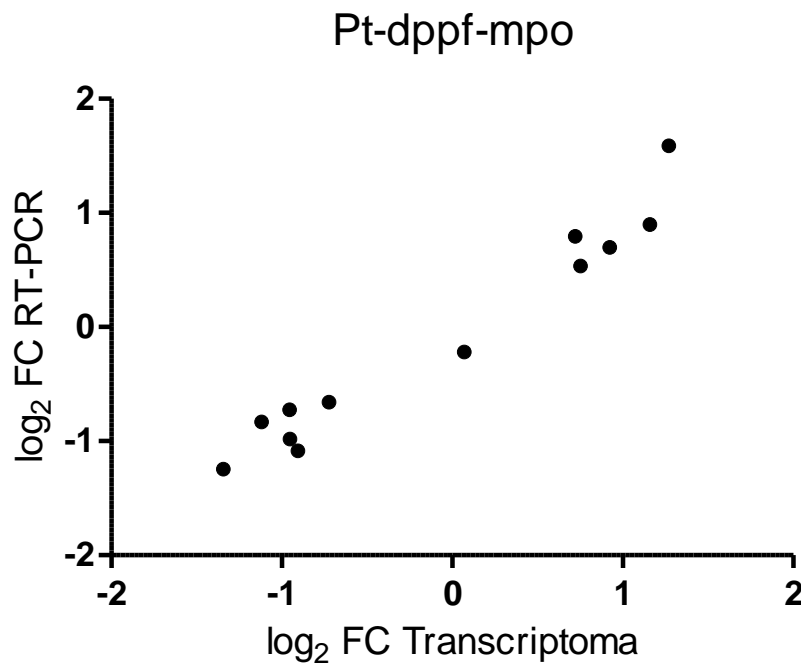


Para la cuantificación de los valores relativos de ARN los datos fueron analizados mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak, 2011). Para ello, los valores fueron normalizados con el gen control de la treonil-tRNA sintetasa y los cambios en los valores de expresión se determinaron en relación a las muestras control. Los valores de  $\log_2$  FC obtenidos mediante RT-PCR se muestran en la Figura 32. Los genes DE analizados incluyen genes de respuesta a estrés (TcCLB.509105.140, TcCLB.510947.50), factores de inicio de la traducción (TcCLB.511383.40), proteínas de unión al ARN (TcCLB.509105.90), procesos de oxidación-reducción (TcCLB.505183.30), ubiquitinación (TcCLB.509161.10), transducción de señales (TcCLB.511269.40, TcCLB.503925.80, TcCLB.510581.20, TcCLB.511653.20) y vías metabólicas específicas (TcCLB.507913.20).



**Figura 32.** Cuantificación relativa de las cantidades de transcripto para los genes diferencialmente expresados mediante qRT-PCR. Se muestra el valor de *fold change* de los transcritos de interés normalizado al gen de la treonil-tRNA sintetasa en parásitos sometidos a tratamiento con el compuesto de platino con respecto a parásitos control sin tratamiento. \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*  $P < 0,01$ , Test de ANOVA con corrección de Bonferroni, comparado con muestras control.

Todos los genes seleccionados por estar expresados diferencialmente en el transcriptoma, también mostraron cambios estadísticamente significativos en parásitos tratados con respecto a parásitos control, usando RT-PCR cuantitativa. Los valores de *fold change* obtenidos mediante qRT-PCR fueron correlacionados con los obtenidos mediante análisis del transcriptoma luego del tratamiento. Se obtuvieron excelentes valores de correlación, presentando un valor de *r* de Pearson de 0,98 para el tratamiento con platino (Figura 33).



**Figura 33.** Correlación de valores de log<sub>2</sub> FC transcriptómicos con los datos de log<sub>2</sub> FC de RT-PCR para 11 genes con expresión diferencial luego del tratamiento y el gen de la citocromo P450 que no presenta cambios.

Los cambios estadísticamente significativos en la expresión y la excelente correlación de los valores del transcriptoma y de la qRT-PCR, permiten validar los ensayos transcriptómicos y las conclusiones extraídas de los mismos.

Las técnicas empleadas en el presente trabajo han permitido identificar rutas metabólicas y familias proteicas interesantes en la búsqueda de nuevos blancos moleculares para el diseño de nuevos compuestos para combatir la enfermedad de Chagas. Entre ellas se destacan la ruta del fosfatidil-inositol la cual está implicada en la supervivencia del parásito y ha sido explorada en *Leishmania spp* para la identificación de blancos moleculares (Velasquez, 2015). Por otro lado, la familia de proteínas *heat shock* ha sido estudiada como posible blanco de compuestos en *T. brucei*

(Pizarro, 2013). Finalmente, las enzimas de la vía de producción de ergosterol también han cobrado un interés particular en los últimos años como potencial blanco para el desarrollo de nuevos compuestos (Kessler, 2013; Urbina, 2009). La validación de alguna de estas proteínas como blancos moleculares de compuestos metálicos ya sintetizados podría representar un adelanto significativo en la búsqueda de nuevas terapias para combatir la enfermedad.

## 5. Conclusiones y perspectivas

---

### 5.1 Conclusiones

En este trabajo se estudió el efecto del hexafluorofosfato Pt-dppf-mpo, 1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno piridina-2-tiolato-1-óxido Pt (II) en *T. cruzi*. Se determinó un valor de IC<sub>50</sub> en el intervalo nanomolar con un valor IS excelente para la cepa CL Brener. El porcentaje de compuesto incorporado por el parásito fue de un 75% cuando se trató con una concentración de 1x el valor de IC<sub>50</sub> calculado y se asoció principalmente con el ADN a las concentraciones ensayadas (5x y 10x IC<sub>50</sub>). Sorprendentemente, los ensayos de vitalidad celular mostraron una alta actividad de esterasa en los parásitos tratados. Sin embargo, a pesar de este aumento en la actividad metabólica, los parásitos mostraron morfología redondeada y pérdida de flagelo acompañada de una reducción en la movilidad al aumentar la concentración del compuesto o el tiempo de incubación. Esto llevó, en ciertas condiciones de incubación, a que el compuesto de platino indujera necrosis en los parásitos con el potencial de membrana mitocondrial colapsado.

El efecto producido por el tratamiento de fármacos en una célula particular, en este caso *T. cruzi*, es un proceso global que afecta directa o indirectamente a muchas moléculas. La identificación de los sistemas enzimáticos implicados y las vías metabólicas contribuyen al desarrollo de una nueva terapia antichagásica eficaz. El análisis del transcriptoma entre parásitos tratados con el compuesto y parásitos control permitió identificar los genes transcritos y analizar aquellos genes que se encuentran expresados diferencialmente. Con el análisis del transcriptoma, en este trabajo, se identificaron genes de respuesta a estrés, factores de inicio de la traducción, proteínas de unión al ARN, procesos de oxidación-reducción, ubiquitinación, transducción de señales y vías metabólicas específicas. Dentro de estas últimas se destacan la ruta del fosfatidilinositol, implicada en la supervivencia del parásito y la vía de producción de ergosterol, explorada para la identificación de blancos moleculares, y que también podría explicar las alteraciones morfológicas y la muerte celular inducida por el tratamiento.

## 5.2 Perspectivas

Los análisis celulares y de los cambios masivos en el transcriptoma permitieron determinar globalmente los procesos afectados en el parásito por este potencial fármaco en la forma epimastigota de *T. cruzi*. Este estadio tiene la ventaja de cultivarse de forma rutinaria en el laboratorio, y actualmente se considera que la aplicabilidad de los resultados depende de las posibilidades de extender los datos descritos en esta forma a otras del ciclo de vida que se dan en el huésped. Debido a las dificultades técnicas para estudiar el estadio intracelular, los estudios de fármacos antichagásicos se han centrado en el análisis de los efectos en epimastigotas para mejorar el diseño de fármacos (Menna-Barreto, 2010; Rodríguez Arce, 2015; Scalese, 2015; Vieites, 2008). Sin embargo, los resultados sientan las bases para ser usados en el ámbito científico para la validación de blancos y mecanismos de acción en amastigotas intracelulares así como en tripomastigotas, los estadios relevantes en vertebrados.

Otra técnica que es especialmente útil para el estudio de tripanosomátidos, es la proteómica. Dado que en estos organismos la transcripción de los genes que codifican para proteínas es constitutiva y por lo tanto la regulación de la expresión génica sería independiente de la regulación del inicio de la transcripción, paso en general preponderante en la definición de la expresión en eucariotas (Menna-Barreto, 2010), la regulación postraduccional cobra mayor importancia. En la última década se han reportado los perfiles proteómicos de diferentes formas de *T. cruzi*, pero todavía es incipiente su análisis en relación a los mecanismos de acción de los potenciales quimioterápicos (Trochine, 2014a; Trochine, 2014b). Además, realizar estudios de proteómica ayudaría a conocer en mayor profundidad cuáles son los sistemas enzimáticos afectados por estos compuestos y los pasos metabólicos en los que están involucrados. Aunque la proteómica constituye una gran promesa como una técnica potente para el análisis en detalle de los cambios globales inducidos por los quimioterápicos, permitiendo identificar proteínas y vías blancos de acción, es importante notar que esta aproximación no incluye, o se encuentran muy poco representadas, a las proteínas de membrana por razones de solubilidad (Gabbiani, 2010). De la misma manera, debido a las limitaciones inherentes de la metodología, las proteínas de baja expresión, pero no por eso menos importantes en los procesos biológicos, quedan también sin ser detectadas.

Actualmente se han desarrollado otras técnicas que permiten acercarse mejor a lo observado a nivel del proteoma, analizando la fracción de ARNm que está siendo activamente traducida (fracción polisomal). El grupo de Weissman describió la técnica de huellas ribosomales (*ribosomal footprinting*), en la cual se purifican los polisomas y se realiza una protección a una RNAsa para luego secuenciar masivamente por RNA-Seq los fragmentos obtenidos (Ingolia, 2009). De esta manera, se puede obtener una visión tanto cualitativa como cuantitativa de la ocupación de ribosomas sobre cada mensajero particular (Ingolia, 2012; Ingolia, 2011). El análisis de perfiles ribosomales resultó ser especialmente útil para obtener mejores estimativos de la expresión génica con respecto a los estudios transcriptómicos en tripanosomátidos (Smircich, 2015).

## 6. Referencias bibliográficas

---

- Agabian, N. 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. 61:1157-1160.
- Aguiar, P.H.F., C.; Repoles, B. M.; Ribeiro, G. A.; Mendes, I. C.; Peloso, E. F.; Gadelha, F. R.; Macedo, A. M.; Franco, G. R.; Pena, S. D.; Teixeira, S. M.; Vieira, L. Q.; Guarneri, A. A.; Andrade, L. O.; Machado, C. R. 2013. Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS neglected tropical diseases*. 7:e2279.
- Alarcon de Noya, B., Diaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., Rivas, L., Castro, J., Marques, J., Mendoza, I., Acquatella, H., Torres, J., Noya, O. 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 201:1308-1315.
- Alvarez, V.E.K., G.; Sant'Anna, C.; Turk, V.; Cazzulo, J. J.; Turk, B. 2008. Autophagy is involved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*. 283:3454-3464.
- Anders, S.P., P. T.; Huber, W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 31:166-169.
- Andrade, H.M.M., S. M.; Chapeaurouge, A.; Perales, J.; Nirde, P.; Romanha, A. J. 2008. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *Journal of proteome research*. 7:2357-2367.
- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Aphasizhev, R.A., I. 2014. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie*. 100:125-131.
- Ariyanayagam, M.R.F., A. H. 2001. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*. 115:189-198.
- Aslett, M.A., C.; Berriman, M.; Brestelli, J.; Brunk, B. P.; Carrington, M.; Depledge, D. P.; Fischer, S.; Gajria, B.; Gao, X.; Gardner, M. J.; Gingle, A.; Grant, G.; Harb, O. S.; Heiges, M.; Hertz-Fowler, C.; Houston, R.; Innamorato, F.; Iodice, J.; Kissinger, J. C.; Kraemer, E.; Li, W.; Logan, F. J.; Miller, J. A.; Mitra, S.; Myler, P. J.; Nayak, V.; Pennington, C.; Phan, I.; Pinney, D. F.; Ramasamy, G.; Rogers, M. B.; Roos, D. S.; Ross, C.; Sivam, D.; Smith, D. F.; Srinivasamoorthy, G.; Stoeckert, C. J., Jr.; Subramanian, S.; Thibodeau, R.; Tivey, A.; Treatman, C.; Velarde, G.; Wang, H. 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic acids research*. 38:D457-462.
- Atwood, J.A., 3rd; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Opperdoes, F. R.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. 309:473-476.
- Bangs, J.D., Crain, P. F., Hashizume, T., McCloskey, J. A., Boothroyd, J. C. 1992. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *The Journal of biological chemistry*. 267:9805-9815.
- 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.

- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M.J., Montgomery, S.P. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 24:655-681.
- Biot, C.D., D. 2010. Bioorganometallic Chemistry and Malaria. *Topics in Organometallic Chemistry*. 32:155-193.
- Bolger, A.M.L., M.; Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 30:2114-2120.
- Brandon, E.F.B., T. M.; Deenen, M. J.; Levink, R.; van der Wal, E.; van Meerveld, J. B.; Bijl, M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H.; Meijerman, I. 2006. Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicology and applied pharmacology*. 211:1-10.
- Breniere, S.F., Bosseno, M. F., Noireau, F., Yacsik, N., Liegeard, P., Aznar, C., Hontebeyrie, M. 2002. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:289-295.
- Buckner, F.S. 2011. Experimental chemotherapy and approaches to drug discovery for *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv Parasitol*. 75:89-119.
- Burgos, J.M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Brusses, B., Favaloro, L., Leguizamon, M. S., Lucero, R. H., Laguens, R., Levin, M. J., Favaloro, R., Schijman, A. G. 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 51:485-495.
- Buscaglia, C.A., Di Noia, J. M. 2003. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 5:419-427.
- Calvo, K.L.R., M. T.; Noguera, N. I.; Garcia, F. 2013. Benznidazole modulates cell proliferation in acute leukemia cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 35:478-486.
- Cantey, P.T., Stramer, S.L., Townsend, R.L., Kamel, H., Ofafa, K., Todd, C.W., Currier, M., Hand, S., Varnado, W., Dotson, E., Hall, C., Jett, P.L., Montgomery, S.P. 2012. The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion*. 52:1922-1930.
- Cardinal, M.V., Lauricella, M. A., Ceballos, L. A., Lanati, L., Marcet, P. L., Levin, M. J., Kitron, U., Gurtler, R. E., Schijman, A. G. 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *International journal for parasitology*. 38:1533-1543.
- CDC. 2014. *Centers for Disease Control and Prevention*. Parasites - American Trypanosomiasis <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.
- Cerecetto, H., González, M. 2012. Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. <http://cedicpy.files.wordpress.com/2012/03/libro20chagas.pdf>.
- Clayton, C. 2013. The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. *PLoS pathogens*. 9:e1003680.



- Clayton, C.E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO journal*. 21:1881-1888.
- Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1:159-219.
- Chávez García, S. 2016. Identificación de transcritos periódicamente expresados y sus múltiples niveles de control mediante el análisis transcriptómico del ciclo proliferativo de *Trypanosoma cruzi*. *Universidad de la República*. Tesis de maestría.
- Chibale, K. 2002. A chemical approach towards understanding the mechanism and reversal of drug resistance in *Plasmodium falciparum*: is it viable? *IUBMB life*. 53:249-252.
- da Silva Augusto, L.M., 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 pathogens*. 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 Pablos, L.M.O., A. 2012. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infection and immunity*. 80:2258-2264.
- De Souza, W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*. 8:269-285.
- De Souza, W., Meyer, H. . 1974. On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *J Protozool*. 21:48-52.
- Deolindo, P., Teixeira-Ferreira, A. S., Melo, E. J., Arnholdt, A. C., Souza, Wd, Alves, E. W., DaMatta, R. A. 2005. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100:33-38.
- Docampo, R.d.S., W.; Miranda, K.; Rohloff, P.; Moreno, S. N. 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature reviews. Microbiology*. 3:251-261.
- Duhagon, M.A.D., B.; Garat, B. 2001. Unusual features of poly[dT-dG].[dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of *Trypanosoma cruzi* genome. *Biochemical and biophysical research communications*. 287:98-103.
- El-Sayed, N.M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Wortley, 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. 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309:409-415.
- El-Sayed, N.M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E. A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D. C., Haas, B. J., Tran, A. N., Wortman, J. R., Alsmark, U. C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J. M., Cerqueira, G. C., Creasy, T., Delcher, A. L., Djikeng, A., Embley, T. M., Hauser, C., Ivens, A. C., Kummerfeld, S. K., Pereira-Leal, J. B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S. L., Shallom, J., Silva, J. C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S. E., Donelson, J. E., Andersson, B., Stuart, K. D., Hall, N. 2005b. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 309:404-409.
- Elias, M.C.M.-P., 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.
- Fairlamb, A.H.B., P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. 1985. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*. 227:1485-1487.
- Fernández, M., Varela, J., Correia, I., Birriel, E., Castiglioni, J., Moreno, V., Costa Pessoa, J., Cerecetto, H., González, M., Gambino, D. 2013. A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton Transactions*. 42:11900-11911.
- Franzen, O., Ochaya, S., Sherwood, E., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. A., Andersson, B. 2011. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with T. cruzi VI CL Brener. *PLoS neglected tropical diseases*. 5:e984.
- Frasch, A.C. 2000. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*. 16:282-286.
- Gabbiani, C.M., F.; Modesti, A.; Messori, L. 2010. Proteomic and metallomic strategies for understanding the mode of action of anticancer metallodrugs. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 10:324-337.
- García-Huertas, P.M.-J., A. M.; Gonzalez, L.; Triana-Chavez, O. 2017. Transcriptome and Functional Genomics Reveal the Participation of Adenine Phosphoribosyltransferase in *Trypanosoma cruzi* Resistance to Benznidazole. *Journal of cellular biochemistry*. 118:1936-1945.
- Genes, C.B., E.; Echeverri, F.; Maya, J. D.; Triana, O. 2011. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasites & vectors*. 4:66.
- Goijman, S.G.F., A. C.; Stoppani, A. O. 1985. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochemical pharmacology*. 34:1457-1461.
- Gomez, C., Esther Ramirez, M., Calixto-Galvez, M., Medel, O., Rodriguez, M. A. 2010. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010:726045.

- Gotz, S.G.-G., J. M.; Terol, J.; Williams, T. D.; Nagaraj, S. H.; Nueda, M. J.; Robles, M.; Talon, M.; Dopazo, J.; Conesa, A. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*. 36:3420-3435.
- Greig, N.W., S.; Patterson, S.; Fairlamb, A. H. 2009. A comparative study of methylglyoxal metabolism in trypanosomatids. *The FEBS journal*. 276:376-386.
- Greig, N.W., S.; Vickers, T. J.; Fairlamb, A. H. 2006. Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical journal*. 400:217-223.
- Hall, B., Bot, C., Wilkinson, S. . 2011. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of biological chemistry* 286. 286:13088-13095.
- Hall, B.S.W., S. R. 2012. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56:115-123.
- Hall, B.S.W., X.; Hu, L.; Wilkinson, S. R. 2010. Exploiting the drug-activating properties of a novel trypanosomal nitroreductase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 54:1193-1199.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R., Michels, P.A. 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Biol Dis* 2:11.
- Hannaert, V., Michels, P.A. 1994. Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J Bioenerg Biomembr* 26.
- Hasne, M.P.C., I.; Soysa, R.; Ullman, B. 2010. A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol*. 76:78-91.
- Hoffmann, A.J., M.; Ochsenreiter, T. 2016. A novel component of the mitochondrial genome segregation machinery in trypanosomes. *Microbial cell*. 3:352-354.
- Huang da, W.S., B. T.; Lempicki, R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*. 4:44-57.
- Iantorno, S.A.D., 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.
- Ingolia, N.T.B., G. A.; Rouskin, S.; McGeachy, A. M.; Weissman, J. S. 2012. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nature protocols*. 7:1534-1550.
- Ingolia, N.T.G., S.; Newman, J. R.; Weissman, J. S. 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*. 324:218-223.
- Ingolia, N.T.L., L. F.; Weissman, J. S. 2011. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*. 147:789-802.
- Irigoin, F., Inada, N. M., Fernandes, M. P., Piacenza, L., Gadelha, F. R., Vercesi, A. E., Radi, R. 2009. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical journal*. 418:595-604.
- Keene, J.D. 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature reviews. Genetics*. 8:533-543.

- Kessler, R.L.S., M. J.; Probst, C. M.; Krieger, M. A. 2013. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PloS one*. 8:e55497.
- 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.
- Kroemer, G. 1997. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell death and differentiation*. 4:443-456.
- Langmead, B.S., S. L. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 9:357-359.
- Lenardo, M.J., Dorfman, D. M., Donelson, J. E. 1985. The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potential role as a cap donor structure. *Molecular and cellular biology*. 5:2487-2490.
- Love, M.I.H., W.; Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*. 15:550.
- Macias, F.L., M. C.; Thomas, M. C. 2016. The Trypanosomatid Pr77-hallmark contains a downstream core promoter element essential for transcription activity of the *Trypanosoma cruzi* L1Tc retrotransposon. *BMC genomics*. 17:105.
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E., Tschudi, C. 2000. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna*. 6:163-169.
- Maya, J.D.R., Y.; Agosin, M.; Ojeda, J. M.; Tellez, R.; Gaule, C.; Morello, A. 1997. Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*. 86:101-106.
- Mejia-Jaramillo, A.M.F., G. J.; Palacio, L.; Triana-Chavez, O. 2011. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & vectors*. 4:169.
- Menna-Barreto, R.F., Beghini, D. G., Ferreira, A. T., Pinto, A. V., De Castro, S. L., Perales, J. 2010. A proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *Journal of proteomics*. 73:2306-2315.
- Michels, P.A., Hannaert, V., Bringaud, F. 2000. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today* 16:482-489.
- Miles, M.A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M. W., Mauricio, I. L. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology*. 136:1509-1528.
- Minning, T.A.W., 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.
- Montella, I.R.S., R.; Valle, D. 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107:437-449.

- Moyersoén, J., Choe, J., Fan, E., Hol, W.G., Michels, P.A. 2004. Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS Microbiol Rev* 28:603-643.
- Nozaki, T., Engel, J. C., Dvorak, J.A. 1996. Cellular and Molecular Biological Analyses of Nifurtimox Resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 55:111-117.
- 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.
- Opperdoes, F.R., Borst, P. 1987. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual review of microbiology*. 41:127-151.
- OPS. 2004. *Organización Panamericana de la Salud*. XIIIa. Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación de *Triatoma infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana por transfusión [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=15350&Itemid=270&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=15350&Itemid=270&lang=es).
- Otero, S., Sulleiro, E., Molina, I., Espiau, M., Suy, A., Martín-Nalda, A., Figueras, C. 2012. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 87:832-836.
- Ouellette, M., Papadopoulou, B. 2009. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. *Journal of biology*. 8:100.
- PAHO. 2016. Pan American Health Organization. Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es).
- Parsons, M. 2004. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol*. 53:717-724.
- Pascutti, M.F.C., G.; Garcia, F.; Manarin, R.; Bottasso, O.; Revelli, S.; Serra, E. 2009. Novel cytostatic activity of the trypanocidal drug Benznidazole. *International immunopharmacology*. 9:739-745.
- Pastro, L.S., 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.
- Pays, E., Vanhamme, L., Berberof, M. 1994. Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annual review of microbiology*. 48:25-52.
- Pedrosa, R.C.D.B., A. F.; Locatelli, C.; Pedrosa, R. C.; Geremias, R.; Wilhelm Filho, D. 2001. Time-dependent oxidative stress caused by benznidazole. *Redox report : communications in free radical research*. 6:265-270.
- Perez-Díaz, L.P., 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. *Biochemical and biophysical research communications*. 436:295-299.

- Piacenza, L.P., 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.
- Pizarro, J.C.H., T.; Senisterra, G.; Wernimont, A. K.; Mackenzie, C.; Norcross, N. R.; Ferguson, M. A.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H.; Hui, R. 2013. Exploring the *Trypanosoma brucei* Hsp83 potential as a target for structure guided drug design. *PLoS neglected tropical diseases*. 7:e2492.
- Rajao, M.A.F., C.; Alves, C. L.; Passos-Silva, D. G.; de Moura, M. B.; Chamber-Reis, B. L.; Kunrath-Lima, M.; Zuma, A. A.; Vieira-da-Rocha, J. P.; Garcia, J. B.; Mendes, I. C.; Pena, S. D.; Macedo, A. M.; Franco, G. R.; de Souza-Pinto, N. C.; de Medeiros, M. H.; Cruz, A. K.; Motta, M. C.; Teixeira, S. M.; Machado, C. R. 2014. Unveiling benzimidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and molecular mutagenesis*. 55:309-321.
- Ramirez, J.D., Guhl, F., Rendon, L. M., Rosas, F., Marin-Neto, J. A., Morillo, C. A. 2010. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS neglected tropical diseases*. 4:e899.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., Marin-Neto J.A. 2010. Chagas disease. *Lancet*. 375:1388-1402.
- Read, L.K.L., J.; Hashimi, H. 2016. Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. 7:33-51.
- Rego, J.V.D., A. P.; Liarte, D. B.; de Carvalho Sousa, F.; Barreto, H. M.; Bua, J.; Romanha, A. J.; Radis-Baptista, G.; Murta, S. M. 2015. Molecular characterization of Cyclophilin (TcCyP19) in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benzimidazole. *Experimental parasitology*. 148:73-80.
- 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.
- Rodrigues Coura, J.a.d.C., S. L. 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:3-24.
- Rodríguez Arce, E., Mosquillo, F., Pérez-Díaz, L., Echeverría, G. A., Piro, O. E., Merlino, A., Coitiño, L. E., Maríngolo Ribeiro, C., Leite, C. Q. F., Pavan, F. R., Otero, L., Gambino, D. 2015. Aromatic amine N-oxide organometallic compounds: searching for prospective agents against infectious diseases. *Dalton Transactions*. 44:14453 - 14464.
- Rohloff, P.D., R. 2008. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Experimental parasitology*. 118:17-24.
- Ruvalcaba-Trejo, L.I.S., N. R. 2011. The *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10 strain maxicircle sequence: the third musketeer. *BMC genomics*. 12:58.
- Salomao, K.D.S., N. A.; Molina, M. T.; De Castro, S. L.; Menna-Barreto, R. F. 2013. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. *BMC microbiology*. 13:196.

- Sanchez-Delgado, R.A., Anzellotti, A., Suarez, L. 2004a. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: malaria, trypanosomiasis, and leishmaniasis. *Metal ions in biological systems*. 41:379-419.
- Sanchez-Delgado, R.A.A., A. 2004b. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 4:23-30.
- Sanchez-Guillen Mdel, C., Lopez-Colombo, A., Ordonez-Toquero, G., Gomez-Albino, I., Ramos-Jimenez, J., Torres-Rasgado, E., Salgado-Rosas, H., Romero-Diaz, M., Pulido-Perez, P., Perez-Fuentes, R. 2006. Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101:733-740.
- Sandes, J.M., Fontes, A., Regis-da-Silva, C. G., de Castro, M. C., Lima-Junior, C. G., Silva, F. P., Vasconcellos, M. L., Figueiredo, R. C. 2014. *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile). *PloS one*. 9:e93936.
- Sauvage, V.A., D.; Escotte-Binet, S.; Villena, I. 2009. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Molecular and biochemical parasitology*. 167:81-94.
- Scalese, G.B., J.; Rostán, S.; Correia, I.; Bradford, L.; Vieites, M.; Minini, L.; Merlino, A.; Coitiño, E.L.; Birriel, E; Varela, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Costa Pessoa, J; Gambino, D. 2015. Expanding the family of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 147: 116 - 125.
- Scalese, G.M., M. F.; Rostan, S.; Castiglioni, J.; Alho, I.; Perez, L.; Correia, I.; Marques, F.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D. 2017. Heteroleptic oxidovanadium(IV) complexes of 2-hydroxynaphthylaldimine and polypyridyl ligands against *Trypanosoma cruzi* and prostate cancer cells. *J Inorg Biochem*. 175:154-166.
- Schenkman, S.P.B., S.; Nardelli, S. C. 2011. Nuclear structure of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol*. 75:251-283.
- Schofield, C.J., Galvao, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*. 110:88-100.
- Schurch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., Roditi, I. 1994. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Molecular and cellular biology*. 14:3668-3675.
- Shapiro, T.A., Englund, P. T. 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual review of microbiology*. 49:117-143.
- Shaw, J.M., J.E. Feagin, K. Stuart, and L. Simpson. 1988. Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell*. 53:401-411.
- Shikanai-Yasuda, M.A., Carvalho, N.B. 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 54:845-852.

- 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 & development*. 23:1063-1076.
- Siegel, T.N.H., D. R.; Wang, X.; Dewell, S.; Cross, G. A. 2010. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic acids research*. 38:4946-4957.
- Silber, A.M.P., C. A. 2012. Assignment of putative functions to membrane "hypothetical proteins" from the *Trypanosoma cruzi* genome. *The Journal of membrane biology*. 245:125-129.
- Smircich, P.E., G.; Bispo, S.; Duhagon, M. A.; Guerra-Slombo, 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.
- Smircich, P.F., D.; El-Sayed, N. M.; Garat, B. 2013. Genomic analysis of sequence-dependent DNA curvature in Leishmania. *PloS one*. 8:e63068.
- Smirlis, D., Soteriadou, K. 2011. Trypanosomatid apoptosis: 'Apoptosis' without the canonical regulators. *Virulence*. 2:253-256.
- Subramanian, A.T., P.; Mootha, V. K.; Mukherjee, S.; Ebert, B. L.; Gillette, M. A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S. L.; Golub, T. R.; Lander, E. S.; Mesirov, J. P. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:15545-15550.
- Tan, T.H., Pach, R., Crausaz, A., Ivens, A., Schneider, A. 2002. tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Molecular and cellular biology*. 22:3707-3717.
- Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., de Souza, W. 2014. Atlas didático Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.
- Teixeira, S.M., De Paiva, R. M., Kangussu-Marcolino, M. M., Darocha, W. D. 2012. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genetics and molecular biology*. 35:1-17.
- 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.
- Trochine, A.A., G.; Corre, S.; Faral-Tello, P.; Duran, R.; Batthyany, C. I.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Robello, C. 2014a. *Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benzimidazole. *Experimental parasitology*. 140:33-38.
- Trochine, A.C., D. J.; Faral-Tello, P.; Barrett, M. P.; Robello, C. 2014b. Benzimidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS neglected tropical diseases*. 8:e2844.
- Turrens, J.F. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular aspects of medicine*. 25:211-220.



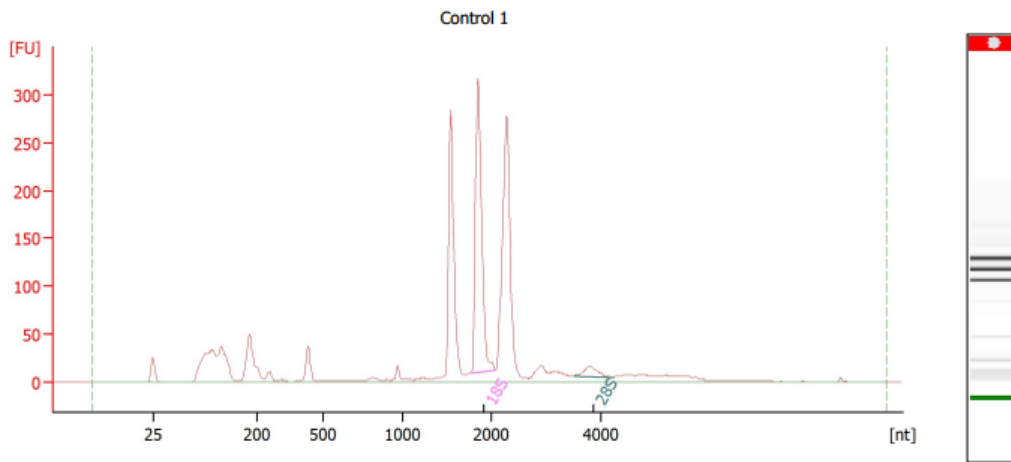
- Ullu, E., Matthews, K. R., Tschudi, C. 1993. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Molecular and cellular biology*. 13:720-725.
- Ullu, E., Tschudi, C. 1991. Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:10074-10078.
- Urbina, J.A. 2009. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 Suppl 1:311-318.
- Veiga-Santos, P., Reignault, L. C., Huber, K., Bracher, F., De Souza, W., De Carvalho, T. M. 2014. Inhibition of NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases (sirtuins) causes growth arrest and activates both apoptosis and autophagy in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 141:814-825.
- Veiga-Santos, P.B., E. S.; Santos, J. F.; de Barros Moreira, T. L.; de Carvalho, T. M.; Urbina, J. A.; de Souza, W. 2012. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International journal of antimicrobial agents*. 40:61-71.
- Velasquez, V.O., R.; Muskus, C. 2015. Detection of molecular targets on the phosphatidylinositol signaling pathway of *Leishmania* spp. through bioinformatics tools and mathematical modeling. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 35:235-246.
- Vieites, M., Smircich, P., Parajon-Costa, B., Rodriguez, J., Galaz, V., Olea-Azar, C., Otero, L., Aguirre, G., Cerecetto, H., Gonzalez, M., Gomez-Barrio, A., Garat, B., Gambino, D. 2008. Potent in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 13:723-735.
- Vieites, M.S., P.; Pagano, M.; Otero, L.; Fischer, F. L.; Terenzi, H.; Prieto, M. J.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D. 2011. DNA as molecular target of analogous palladium and platinum anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: a comparative study. *J Inorg Biochem*. 105:1704-1711.
- Virreira, M., Serrano, G., Maldonado, L., Svoboda, M. 2006. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from bolivian patients. *Acta tropica*. 100:252-255.
- Wahle, E., Keller, W. 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annual review of biochemistry*. 61:419-440.
- Wharton, R.P.A., A. K. 2006. mRNA regulation by Puf domain proteins. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2006:pe37.
- WHO. 2002. *World Health Organization*. Control de la enfermedad de Chagas [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_905\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905_spa.pdf).
- WHO. 2014a. *World Health Organization*. Chagas disease (American trypanosomiasis) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- WHO. 2014b. *World Health Organization*. Chagas disease (American trypanosomiasis) [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/chagas/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/).
- WHO. 2016. *World Health Organization*. Chagas disease (American trypanosomiasis). <http://www.who.int/chagas/disease/en/>.

- Wilkinson, S.R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., Cheeseman, I. 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:5022-5027.
- Wilkinson, S.R.K., J. M. 2003. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biological chemistry*. 384:517-525.
- Wilkinson, S.R.K., J. M. 2009. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert reviews in molecular medicine*. 11:e31.
- Wilkinson, S.R.M., D. J.; Taylor, M. C.; Bromley, E. V.; Miles, M. A.; Kelly, J. M. 2002a. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. *The Journal of biological chemistry*. 277:17062-17071.
- Wilkinson, S.R.O., S. O.; Mauricio, I. L.; Kelly, J. M. 2002b. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:13453-13458.
- Wilkinson, S.R.T., M. C.; Touitha, S.; Mauricio, I. L.; Meyer, D. J.; Kelly, J. M. 2002c. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal*. 364:787-794.
- Wilkinson, S.R.T., 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.
- Wu, P.N., T. E.; Clausen, M. H. 2015. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*. 36:422-439.
- Yamanaka, C.N.G., R. B.; Rezende, C. O., Jr.; Eger, I.; Kessler, R. L.; Tonini, M. L.; de Moraes, M. H.; Araujo, D. P.; Zuanazzi, J. A.; de Almeida, M. V.; Steindel, M. 2013. Assessment of leishmanicidal and trypanocidal activities of aliphatic diamine derivatives. *Chemical biology & drug design*. 82:697-704.
- Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G. A., Lopez, E., Gonzalez, N., Patterson, J. S., Gaunt, M. W., de Arias, A. R., Miles, M. A. 2005. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International journal for parasitology*. 35:225-233.
- Zamzami, N.H., T.; Dallaporta, B.; Petit, P. X.; Kroemer, G. 1997. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr*. 29:185-193.
- 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. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104:1051-1054.

- Zingales, B., Pereira, M. E., Oliveira, R. P., Almeida, K. A., Umezawa, E. S., Souto, R. P., Vargas, N., Cano, M. I., da Silveira, J. F., Nehme, N. S., Morel, C. M., Brener, Z., Macedo, A. 1997. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta tropica*. 68:159-173.
- Zingales, B.A., R. G.; Moreno, M.; Franco, J.; Aguiar, P. H.; Nunes, S. L.; Silva, M. N.; lenne, S.; Machado, C. R.; Brandao, A. 2015. A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110:433-444.

## 7. Anexo

### 7.1 Bioanalyzer 2100 expert Eukaryote Total RNA Nano

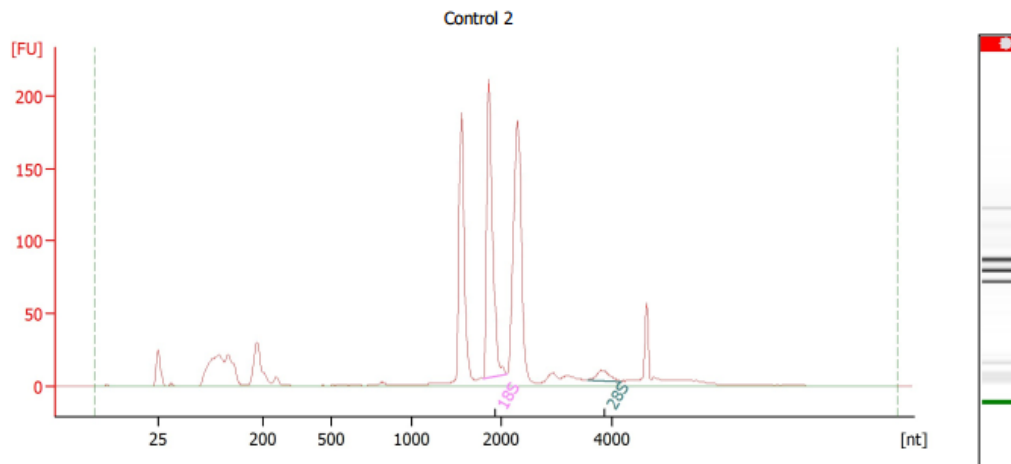


**Overall Results for sample 1 : Control 1**

RNA Area:	1,600.7	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	822 ng/µl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #cccccc; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.1	Result Flagging Label:	RIN N/A

**Fragment table for sample 1 : Control 1**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,783	2,077	314.2	19.6
28S	3,505	4,226	20.6	1.3

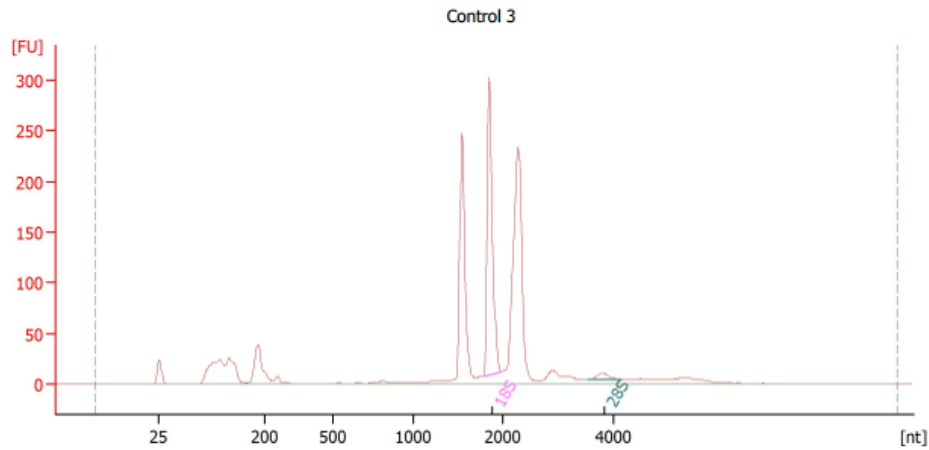


**Overall Results for sample 2 : Control 2**

RNA Area:	1,005.6	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	517 ng/µl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #cccccc; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.1	Result Flagging Label:	RIN N/A

**Fragment table for sample 2 : Control 2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,795	2,109	202.6	20.1
28S	3,560	4,161	12.1	1.2

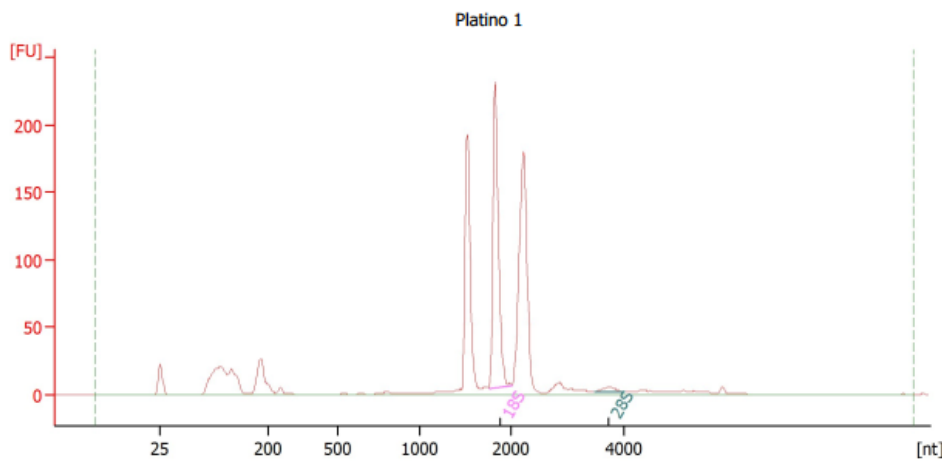


**Overall Results for sample 3 : Control 3**

RNA Area:	1,257.7	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	646 ng/μl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #cccccc; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.0	Result Flagging Label:	RIN N/A

**Fragment table for sample 3 : Control 3**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,787	1,977	257.4	20.5
28S	3,529	4,129	11.0	0.9

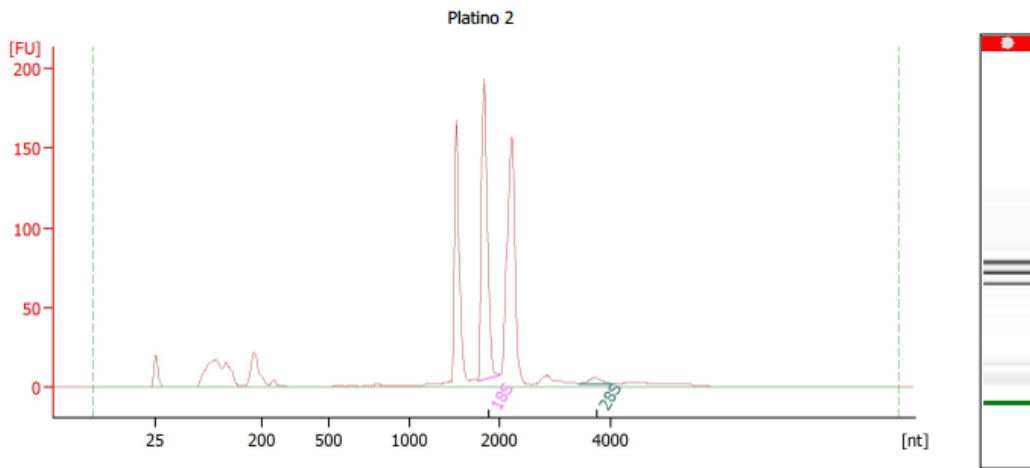


**Overall Results for sample 7 : Platino 1**

RNA Area:	922.7	RNA Integrity Number (RIN):	N/A (B.02.08)
RNA Concentration:	474 ng/μl	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #cccccc; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
rRNA Ratio [28s / 18s]:	0.0	Result Flagging Label:	RIN N/A

**Fragment table for sample 7 : Platino 1**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,760	2,022	207.9	22.5
28S	3,470	4,012	5.8	0.6

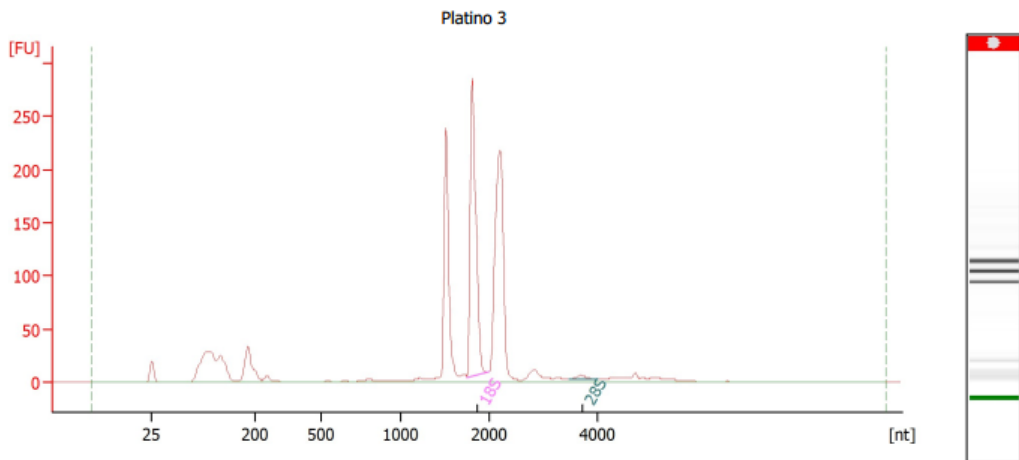


**Overall Results for sample 8 : Platino 2**

RNA Area: 798.7      RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)  
 RNA Concentration: 410 ng/µl      Result Flagging Color:   
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.0      Result Flagging Label: RIN N/A

**Fragment table for sample 8 : Platino 2**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,766	2,020	178.7	22.4
28S	3,430	4,091	6.6	0.8



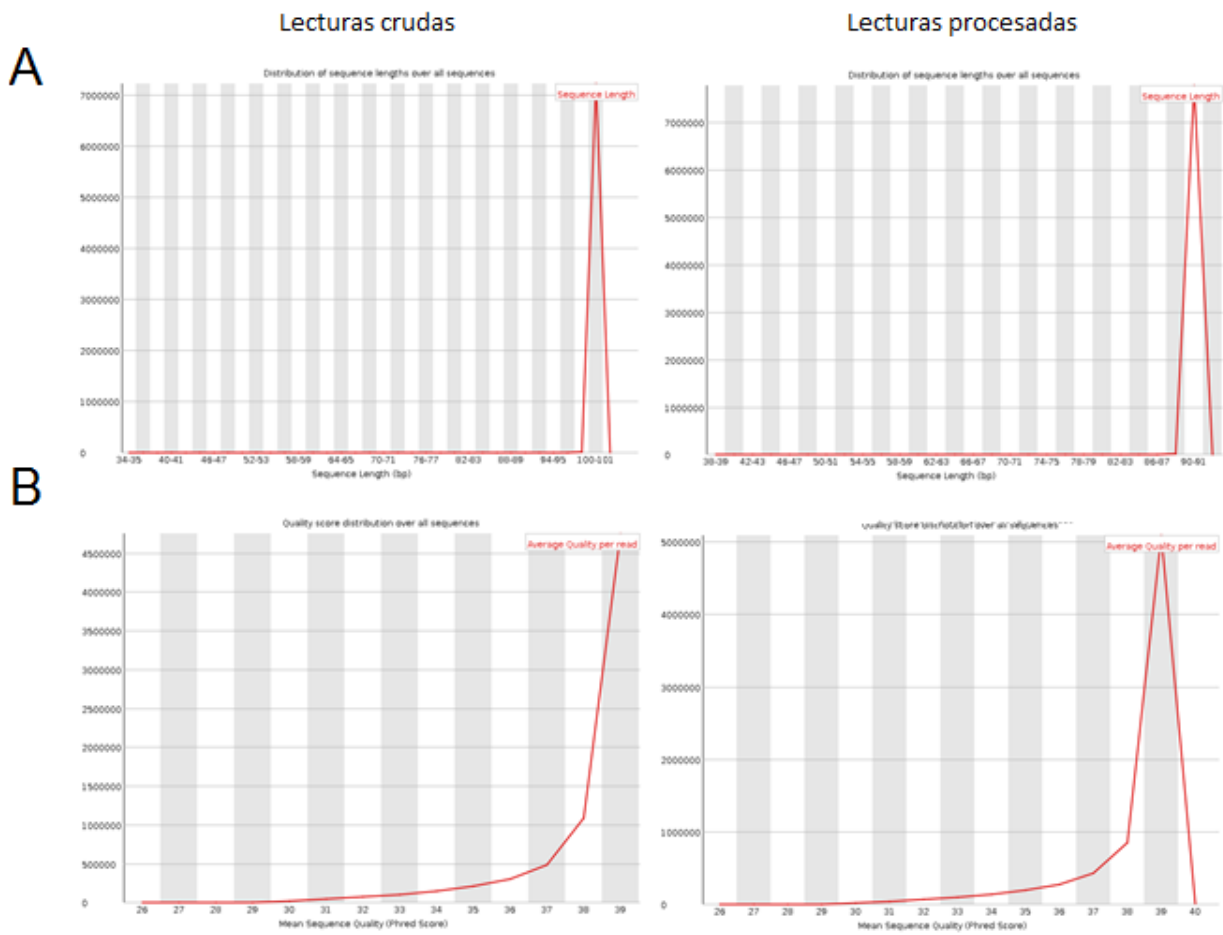
**Overall Results for sample 9 : Platino 3**

RNA Area: 1,171.6      RNA Integrity Number (RIN): N/A (B.02.08)  
 RNA Concentration: 602 ng/µl      Result Flagging Color:   
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 0.0      Result Flagging Label: RIN N/A

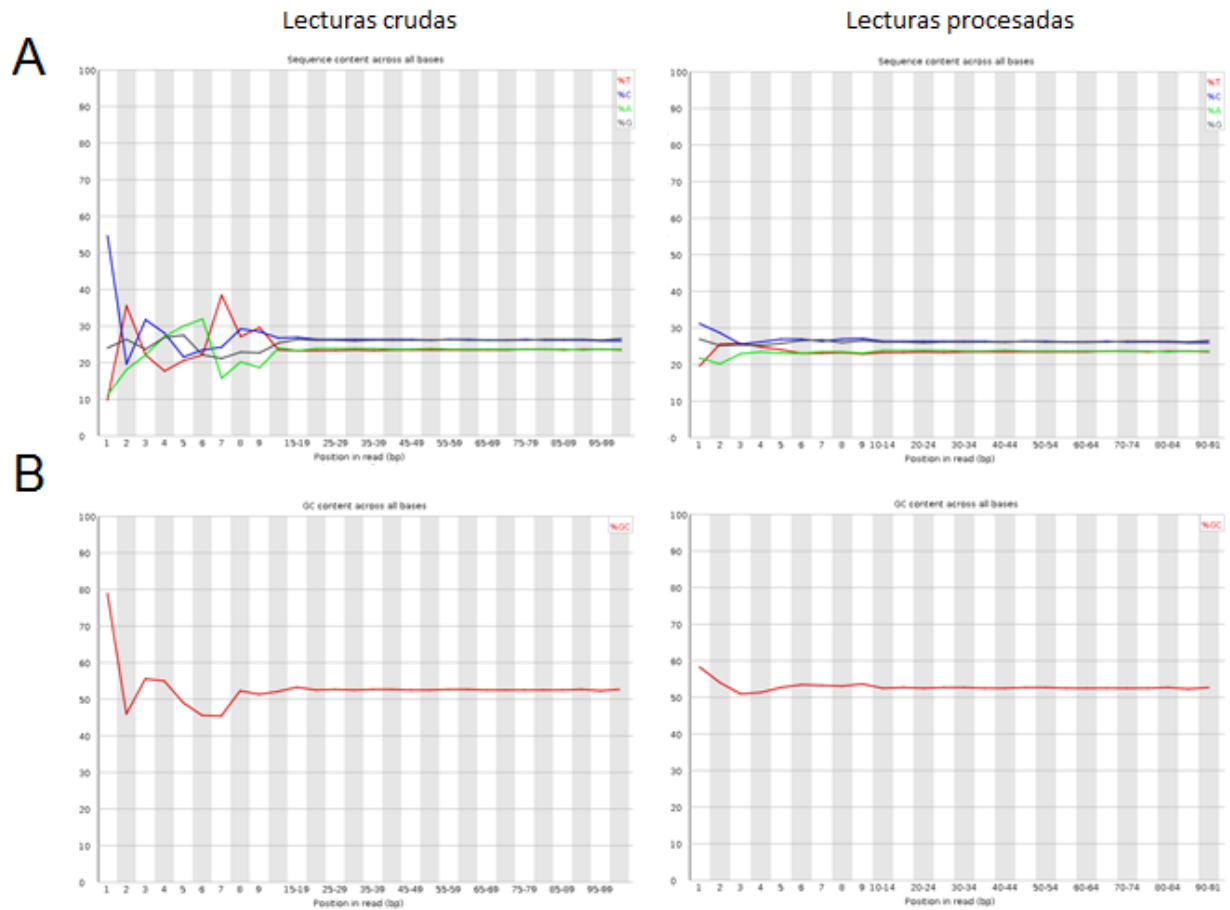
**Fragment table for sample 9 : Platino 3**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,745	1,992	265.7	22.7
28S	3,463	3,994	5.3	0.5

## 7.2 Calidad de las secuencias de RNA-Seq

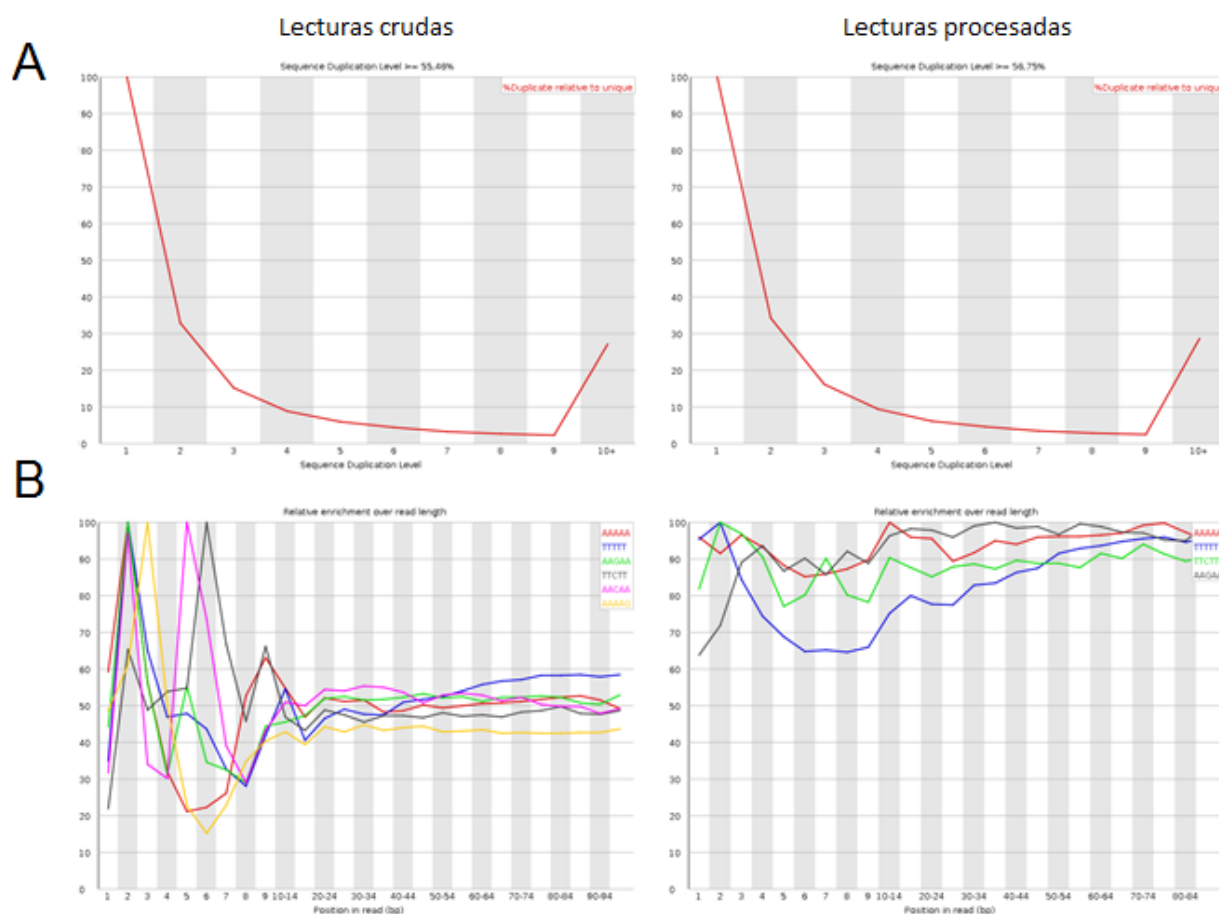


**Anexo A1.** Distribución de tamaño por secuencia (A) y puntajes de calidad por secuencia (B) reportados por el programa FastQC para la muestra Control 1. Para las otras muestras analizadas los resultados fueron similares.



**Figura A2.** Contenido de secuencia por base (A) y el contenido GC por base (B) reportados por el programa FastQC para la muestra Control 1. Para las otras muestras analizadas los resultados fueron similares.





**Figura A3.** Niveles de duplicación por secuencia (A) y el contenido de Kmeros (B) reportados por el programa FastQC para la muestra Control 1.

### 7.3 Lista de genes sobre-expresados ( $\log_2 FC > 0,5$ ; $FDR < 0,01$ )

Gen ID	$\log_2 FC$	FDR	Descripción
TcCLB.506275.121	1,392	2,24E-10	hypothetical protein
TcCLB.509161.10	1,270	2,86E-23	ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative
TcCLB.510581.20	1,158	7,96E-15	receptor-type adenylate cyclase, putative
TcCLB.507063.70	1,137	8,99E-20	trans-sialidase, Group II, putative
TcCLB.503583.100	1,102	1,49E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506009.10	1,080	7,87E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511635.80	1,027	2,25E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506479.120	1,004	2,09E-08	cytidine triphosphate synthase, putative
TcCLB.508857.30	0,993	1,39E-14	trans-sialidase, Group I, putative
TcCLB.507515.100	0,992	8,81E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508859.118	0,983	7,46E-08	trans-sialidase, putative
TcCLB.506193.60	0,961	1,74E-22	ascorbate peroxidase, putative
TcCLB.511653.20	0,924	5,33E-05	dual-specificity protein phosphatase, putative
TcCLB.508799.270	0,842	3,74E-22	protein associated with differentiation 4, putative

TcCLB.508065.70	0,840	2,24E-05	protein associated with differentiation 8, putative
TcCLB.510729.140	0,821	4,74E-05	NIMA-related kinase, putative
TcCLB.510305.70	0,811	1,78E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506721.30	0,810	1,79E-08	calpain-like cysteine peptidase, putative
TcCLB.508669.10	0,803	1,02E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506241.80	0,777	6,80E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508153.560	0,769	9,08E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511465.20	0,764	2,81E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509105.140	0,752	6,76E-26	heat shock protein 85, putative
TcCLB.510223.9	0,750	4,98E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509105.150	0,750	4,90E-28	heat shock protein 85, putative
TcCLB.510333.10	0,750	6,81E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511907.89	0,749	1,49E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.510575.210	0,744	6,69E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509643.139	0,744	4,29E-23	Heat shock protein 83, putative
TcCLB.510335.10	0,741	1,49E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.504109.30	0,737	2,11E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509643.130	0,734	3,62E-26	heat shock protein 85, putative
TcCLB.511291.50	0,722	2,43E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511269.40	0,720	2,71E-05	cAMP phosphodiesterase A, putative
TcCLB.505183.130	0,720	4,26E-09	sugar transporter, putative
TcCLB.508661.70	0,718	2,30E-08	Enriched in surface-labeled proteome protein 18
TcCLB.508857.130	0,717	4,65E-11	hypothetical protein, conserved
TcCLB.504021.10	0,709	3,08E-06	G1 cyclin CycE4, putative
TcCLB.511565.30	0,703	4,69E-03	mucin TcMUCII, putative
TcCLB.508175.200	0,700	8,97E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509287.80	0,699	4,27E-08	trans-sialidase, Group VII, putative
TcCLB.503411.30	0,693	1,78E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506679.80	0,689	2,05E-04	SNF1-related protein kinases, putative
TcCLB.508797.10	0,687	3,31E-04	tubulin-tyrosine ligase-like protein, putative
TcCLB.506439.9	0,680	7,49E-05	myosin heavy chain, putative
TcCLB.503559.70	0,676	2,31E-06	cystinosin, putative
TcCLB.507073.20	0,666	3,75E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511821.179	0,659	8,26E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509605.20	0,658	5,35E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509713.30	0,655	5,25E-21	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508461.310	0,647	5,87E-05	protein kinase A catalytic subunit isoform 1, putative
TcCLB.506355.10	0,643	1,62E-16	glucose transporter
TcCLB.504021.20	0,641	4,77E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511317.50	0,632	1,56E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508859.90	0,627	3,26E-03	phosphatidylinositol 3-kinase 2, putative
TcCLB.503583.80	0,626	3,57E-04	dual specificity protein phosphatase or MAP kinase phosphatase, putative
TcCLB.511511.150	0,625	5,76E-08	sphingosine 1-phosphate lyase, putative
TcCLB.510359.290	0,624	2,51E-04	hypothetical protein, conserved

TcCLB.511367.240	0,623	9,77E-09	PIWI-like protein
TcCLB.506327.40	0,622	2,90E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508153.440	0,621	5,86E-07	poly(A) polymerase, putative
TcCLB.506791.10	0,617	1,34E-04	CYC2-like cyclin 4, putative
TcCLB.504741.250	0,615	1,59E-04	protein kinase, putative
TcCLB.511809.90	0,614	9,79E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509857.40	0,613	1,04E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508409.160	0,611	5,63E-05	thymine-7-hydroxylase, putative
TcCLB.506355.5	0,610	8,81E-07	hexose transporter, putative
TcCLB.508119.200	0,607	1,06E-06	hypothetical protein
TcCLB.506153.20	0,607	1,04E-10	amino acid transporter, putative
TcCLB.506153.10	0,604	2,90E-13	amino acid transporter, putative
TcCLB.424123.20	0,601	4,73E-04	paraflagellar rod component, putative
TcCLB.511825.240	0,599	2,08E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508543.180	0,599	1,83E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508231.190	0,596	5,38E-03	ATP-binding cassette protein subfamily G
TcCLB.511821.20	0,592	1,53E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506559.190	0,591	1,22E-03	kinatase, putative
TcCLB.511671.130	0,591	1,64E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508303.40	0,590	2,75E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511725.30	0,590	2,38E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506477.60	0,587	5,79E-03	protein kinase, putative
TcCLB.509569.30	0,587	7,06E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511865.90	0,587	7,95E-03	dynein heavy chain, putative
TcCLB.504223.10	0,583	8,97E-08	amino acid permease, putative
TcCLB.511283.130	0,583	6,15E-03	MEKK-related kinase 1, putative
TcCLB.511661.100	0,583	2,76E-04	protein kinase, putative
TcCLB.508817.110	0,581	1,76E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509001.20	0,581	2,20E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511151.54	0,580	6,01E-05	surface protease GP63, putative
TcCLB.506053.10	0,577	4,23E-10	amino acid transporter, putative
TcCLB.506041.60	0,577	4,06E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509719.40	0,574	3,75E-06	cytochrome P450, putative
TcCLB.506149.10	0,574	7,00E-08	folate/pteridine transporter, putative
TcCLB.504199.10	0,572	3,08E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507087.70	0,572	3,04E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509287.230	0,569	1,78E-03	trans-sialidase, Group II, putative
TcCLB.508461.280	0,568	1,19E-03	protein kinase A catalytic subunit isoform 2, putative
TcCLB.511283.240	0,567	5,08E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506247.310	0,565	5,16E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.504105.100	0,563	4,08E-04	hypothetical protein
TcCLB.503939.84	0,560	2,13E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.510887.30	0,560	7,72E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511483.10	0,557	1,64E-03	hypothetical protein
TcCLB.507515.140	0,556	4,91E-03	oxysterol-binding protein, putative

TcCLB.510671.10	0,555	1,84E-04	dispersed gene family protein 1 (DGF-1), putative
TcCLB.511837.110	0,555	2,11E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511245.120	0,554	2,40E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507241.30	0,552	4,29E-09	arginine kinase
TcCLB.507087.30	0,547	5,13E-03	Peptidase C19, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative
TcCLB.509713.10	0,546	3,95E-08	protein associated with differentiation 4, putative
TcCLB.503559.90	0,546	3,23E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.504003.30	0,544	2,71E-04	hypothetical protein
TcCLB.506469.30	0,543	1,37E-03	protein kinase, putative
TcCLB.509023.160	0,542	3,28E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508957.30	0,542	4,49E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507491.90	0,542	1,48E-03	protein kinase, putative
TcCLB.504105.160	0,542	1,52E-05	splicing factor ptrs1 interacting protein, putative
TcCLB.509713.20	0,540	4,56E-09	protein associated with differentiation 4, putative
TcCLB.509663.37	0,540	7,84E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508817.170	0,538	4,57E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507019.10	0,538	3,72E-03	protein kinase, putative
TcCLB.509859.70	0,537	7,63E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506445.110	0,537	1,92E-07	nucleobase transporter, putative
TcCLB.507949.250	0,536	1,07E-11	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508231.9	0,533	1,41E-08	hexose transporter, putative
TcCLB.510245.10	0,532	2,45E-08	amino acid permease, putative
TcCLB.507073.49	0,531	8,44E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509017.50	0,530	2,77E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509997.20	0,529	2,63E-04	tryparedoxin 2, putative
TcCLB.511633.79	0,524	7,92E-06	microtubule-associated protein, putative
TcCLB.508153.950	0,524	5,01E-04	6-phosphofructo-2-kinase 1
TcCLB.511169.29	0,523	2,21E-03	tubulin-tyrsoine ligase-like protein, putative
TcCLB.508801.10	0,523	1,04E-03	protein associated with differentiation 4, putative
TcCLB.511633.70	0,522	1,54E-03	protein kinase, putative
TcCLB.506247.370	0,522	1,27E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511291.40	0,522	4,03E-04	protein kinase, putative
TcCLB.511003.160	0,514	3,17E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511657.10	0,510	8,26E-03	protein kinase, putative
TcCLB.511249.100	0,510	2,76E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508873.330	0,509	8,81E-07	trans-sialidase, Group V, putative
TcCLB.510679.70	0,508	5,30E-04	lipase, putative
TcCLB.511159.14	0,506	3,45E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511661.120	0,506	8,91E-03	protein kinase, putative
TcCLB.506151.20	0,506	1,25E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511245.240	0,505	2,62E-03	serine/threonine protein kinase, putative
TcCLB.507649.20	0,504	1,65E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506319.60	0,501	8,39E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509943.20	0,501	7,91E-07	cAMP specific phosphodiesterase, putative

TcCLB.509937.120	0,500	2,56E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506611.70	0,500	1,27E-03	surface protease GP63, putative
TcCLB.507743.9	0,500	3,55E-03	tyrosine protein kinase, putative

#### 7.4 Lista de genes sub-expresados ( $\log_2 FC < -0,5$ ; $FDR < 0,01$ )

Gen ID	log2FC	FDR	Descripción
TcCLB.510947.50	-1,344	8,66E-44	cyclophilin, putative
TcCLB.511899.40	-1,233	5,17E-55	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative
TcCLB.507913.20	-1,119	9,91E-18	phosphomevalonate kinase protein, putative
TcCLB.511899.10	-1,118	7,37E-27	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative
TcCLB.507057.40	-1,099	4,39E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507583.20	-1,068	3,81E-19	nucleolar protein, putative
TcCLB.506627.100	-1,004	1,22E-11	hypothetical protein, conserved
TcCLB.503925.80	-0,954	3,71E-07	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
TcCLB.505183.30	-0,953	3,18E-29	malic enzyme, putative
TcCLB.509253.30	-0,937	2,90E-13	3-Beta-hydroxysteroid-delta(8), delta(7)-isomerase, putative
TcCLB.509715.40	-0,932	1,44E-17	fibrillarin, putative
TcCLB.504839.50	-0,924	2,39E-18	nucleosome assembly protein-like protein, putative
TcCLB.506821.110	-0,913	5,18E-14	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509105.90	-0,906	1,31E-17	MRB1-associated protein, putative
TcCLB.509793.40	-0,896	1,30E-15	kinetoplast-associated protein
TcCLB.511025.70	-0,888	1,53E-20	chaperonin alpha subunit, putative
TcCLB.506195.300	-0,843	4,96E-15	deoxyhypusine synthase, putative
TcCLB.508593.110	-0,842	3,90E-12	arginine N-methyltransferase, putative
TcCLB.507649.70	-0,838	1,38E-22	nucleolar RNA-binding protein, putative
TcCLB.511367.138	-0,827	1,39E-14	chaperone DNAJ protein, putative
TcCLB.510445.50	-0,818	1,32E-16	S-adenosylmethionine synthetase, putative
TcCLB.508173.40	-0,804	9,58E-17	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
TcCLB.510687.120	-0,796	1,18E-07	snoRNP protein GAR1, putative
TcCLB.511491.70	-0,792	5,29E-18	endosomal integral membrane protein, putative
TcCLB.508269.60	-0,790	1,07E-06	exosome-associated protein 4, putative
TcCLB.510943.50	-0,788	2,98E-20	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
TcCLB.508971.30	-0,787	1,77E-19	lysyl-tRNA synthetase, putative
TcCLB.508173.180	-0,783	1,79E-11	mRNA transport regulator MTR2, putative
TcCLB.511281.40	-0,783	3,37E-15	Mevalonate-diphosphate decarboxylase, putative
TcCLB.511283.124	-0,781	6,50E-11	mitochondrial carrier protein, putative
TcCLB.503809.120	-0,780	2,75E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508641.184	-0,773	1,80E-07	Eukaryotic translation initiation factor 1, putative
TcCLB.510153.19	-0,760	2,63E-10	tricarboxylate carrier, putative
TcCLB.510657.90	-0,757	9,10E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511033.20	-0,755	7,35E-07	hypothetical protein

TcCLB.508153.820	-0,755	4,57E-07	inorganic pyrophosphatase, putative
TcCLB.510901.10	-0,752	4,11E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511287.150	-0,751	1,26E-09	fibrillarlin, putative
TcCLB.508355.160	-0,749	1,13E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511367.60	-0,738	1,79E-14	Lupus La protein homolog, putative
TcCLB.506201.154	-0,734	1,90E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509795.30	-0,731	3,06E-10	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511287.90	-0,727	1,91E-10	ribosome biogenesis protein, putative
TcCLB.510001.10	-0,727	1,38E-09	hypothetical Zinc-finger containing protein
TcCLB.511383.40	-0,724	6,85E-08	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
TcCLB.509693.80	-0,723	1,87E-06	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative
TcCLB.511725.250	-0,723	1,28E-14	chaperonin containing t-complex protein, putative
TcCLB.507765.130	-0,722	2,25E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509261.30	-0,719	1,13E-10	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative
TcCLB.508707.227	-0,719	1,34E-04	ATP binding protein-like protein, putative
TcCLB.511661.40	-0,717	2,37E-07	signal peptidase type I, putative
TcCLB.504113.30	-0,710	6,22E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506247.40	-0,707	2,87E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507513.50	-0,695	9,99E-08	heat shock 70 kDa protein, putative
TcCLB.508461.410	-0,693	7,40E-12	T-complex protein 1, eta subunit, putative
TcCLB.510901.200	-0,691	1,65E-11	differentiation inhibitory kinase, putative
TcCLB.509733.110	-0,684	1,12E-12	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509319.90	-0,683	2,19E-11	trypanothione synthetase
TcCLB.506583.10	-0,681	1,27E-03	U2 small nuclear ribonucleoprotein 16.5K, putative
TcCLB.508153.640	-0,680	9,01E-11	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, putative
TcCLB.507519.140	-0,679	4,39E-09	Adenine phosphoribosyltransferase, putative
TcCLB.507031.29	-0,674	3,33E-09	nucleosome assembly protein, putative
TcCLB.503945.10	-0,672	1,35E-05	eukaryotic translation initiation factor 1A, putative
TcCLB.509937.20	-0,669	1,51E-15	Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme
TcCLB.504003.60	-0,669	1,15E-12	chaperonin/T-complex protein 1 gamma subunit, putative
TcCLB.509179.110	-0,668	4,92E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508027.70	-0,667	5,86E-07	ATP-dependent RNA helicase, putative
TcCLB.506247.450	-0,666	1,87E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508897.110	-0,664	2,21E-07	macrophage infectivity potentiator, precursor, putative
TcCLB.510099.120	-0,658	2,06E-18	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
TcCLB.503625.10	-0,657	4,63E-08	asparagine synthetase a, putative
TcCLB.511727.140	-0,656	1,53E-14	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative
TcCLB.503809.110	-0,653	7,06E-07	phosphatidic acid phosphatase protein, putative
TcCLB.510003.20	-0,652	3,16E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506297.300	-0,651	1,57E-07	eukaryotic release factor 3, putative

TcCLB.503471.10	-0,649	2,84E-11	protein tyrosine phosphatase, putative
TcCLB.503923.30	-0,648	2,03E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508269.30	-0,647	1,60E-05	translation initiation factor 2 subunit, putative
TcCLB.508641.200	-0,646	8,43E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506315.100	-0,643	4,54E-09	protein phosphatase 2C, putative
TcCLB.507005.4	-0,638	1,83E-03	acyl transferase-like protein
TcCLB.509799.140	-0,636	1,66E-08	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial, putative
TcCLB.510299.50	-0,636	6,71E-10	GPI alpha-mannosyltransferase III
TcCLB.508153.1074	-0,629	5,00E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511389.130	-0,627	1,75E-05	diphthine synthase, putative
TcCLB.507053.180	-0,626	1,17E-12	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508707.70	-0,625	2,92E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509213.100	-0,624	3,72E-09	3-ketoacyl-CoA reductase, putative
TcCLB.506263.30	-0,622	1,74E-03	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
TcCLB.507659.10	-0,621	5,87E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.510155.180	-0,620	5,86E-07	Eukaryotic initiation factor 4A-1
TcCLB.511289.30	-0,620	1,42E-10	metallo-peptidase, Clan MG, Family M24
TcCLB.508881.30	-0,620	4,43E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509237.50	-0,618	1,78E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508815.70	-0,617	1,24E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511761.60	-0,611	2,87E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508411.10	-0,608	1,78E-06	cofilin/actin depolymerizing factor, putative
TcCLB.504069.90	-0,604	1,08E-05	centromere/microtubule binding protein cbf5, putative
TcCLB.510423.40	-0,604	6,58E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506247.330	-0,603	4,23E-13	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
TcCLB.510731.68	-0,603	8,91E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511261.160	-0,602	2,77E-05	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit, putative
TcCLB.506275.20	-0,601	5,83E-08	ATP-dependent protease subunit HslV, putative
TcCLB.507023.50	-0,600	6,24E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509161.20	-0,599	3,48E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506247.50	-0,599	6,73E-15	T-complex protein 1, theta subunit, putative
TcCLB.510817.60	-0,598	9,14E-09	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508479.274	-0,596	4,70E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508153.1100	-0,595	2,54E-06	mitochondrial protein 99, putative
TcCLB.503995.50	-0,594	1,00E-08	oligopeptidase b
TcCLB.510659.250	-0,592	3,75E-06	phospholipase A1, putative
TcCLB.509911.90	-0,591	7,18E-11	peptidase, putative
TcCLB.508351.40	-0,590	2,32E-04	cytochrome c oxidase assembly factor, putative
TcCLB.507969.30	-0,589	1,99E-05	sphingosine-1-phosphate phosphatase, putative
TcCLB.508173.264	-0,588	1,02E-07	peripherally associated ATOM36
TcCLB.508479.350	-0,588	3,05E-04	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit j

TcCLB.507017.40	-0,587	3,23E-12	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative
TcCLB.510729.80	-0,587	2,87E-07	Mitochondrial import receptor subunit ATOM40, putative
TcCLB.509053.70	-0,586	5,76E-08	p22 protein precursor, putative
TcCLB.506989.110	-0,584	5,14E-04	NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I subunit, putative
TcCLB.504109.140	-0,583	2,35E-03	DNA-directed RNA polymerase I subunit, putative
TcCLB.509561.70	-0,583	5,86E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.505163.80	-0,580	4,62E-11	oligosaccharyl transferase subunit, putative
TcCLB.506235.20	-0,577	7,66E-07	guide RNA associated protein 1, putative
TcCLB.511237.100	-0,576	6,04E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511719.30	-0,575	2,44E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509215.40	-0,573	2,01E-07	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
TcCLB.508153.1140	-0,573	5,62E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507681.60	-0,572	3,65E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.503843.10	-0,571	5,80E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506839.70	-0,568	8,82E-05	NADH dehydrogenase, putative
TcCLB.508891.60	-0,567	2,59E-03	serine/threonine protein phosphatase, putative
TcCLB.508177.120	-0,566	1,25E-11	cystathionine beta-synthase
TcCLB.507241.39	-0,564	3,36E-07	ABC transporter, putative
TcCLB.511895.69	-0,563	4,92E-04	C-5 sterol desaturase, putative
TcCLB.506669.10	-0,562	3,23E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.510421.130	-0,562	3,48E-07	mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative
TcCLB.510435.20	-0,560	5,30E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.510339.54	-0,559	2,32E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507019.40	-0,559	2,30E-08	histidyl-tRNA synthetase
TcCLB.508821.40	-0,557	5,42E-08	hypothetical protein, conserved
TcCLB.510647.30	-0,557	7,68E-06	tryptophanyl-tRNA synthetase, putative
TcCLB.506831.40	-0,557	2,63E-04	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
TcCLB.507005.70	-0,554	2,60E-04	pre-rRNA-processing protein PNO1, putative
TcCLB.510661.80	-0,554	6,37E-04	hypothetical protein
TcCLB.503917.14	-0,554	1,73E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.504741.180	-0,553	2,24E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506263.20	-0,550	2,02E-10	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
TcCLB.506905.50	-0,548	1,78E-10	cystathionine beta-synthase
TcCLB.508175.370	-0,548	7,89E-08	glutamine synthetase, putative
TcCLB.509611.100	-0,548	1,44E-03	lipoate-protein ligase, putative
TcCLB.510899.59	-0,547	2,98E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508153.900	-0,547	6,88E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508891.10	-0,546	4,98E-03	dolichyl-P-Man:GDP-ManGlcNAc2-PP-dolichyl beta-1,4-mannosyltransferase, putative
TcCLB.503999.10	-0,546	3,64E-09	squalene monooxygenase, putative
TcCLB.508707.80	-0,545	1,03E-03	RNA-binding protein, putative
TcCLB.510421.320	-0,545	6,49E-06	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit, putative



TcCLB.506297.94	-0,545	2,40E-05	60S ribosomal protein L24, putative
TcCLB.510729.160	-0,543	2,13E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507943.10	-0,543	6,93E-03	histone H4, putative
TcCLB.506585.40	-0,543	3,12E-13	glucose-regulated protein 78, putative
TcCLB.509033.80	-0,542	3,36E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506619.10	-0,541	9,39E-06	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, putative
TcCLB.504131.140	-0,541	4,91E-07	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506629.30	-0,540	1,47E-06	guide RNA-binding protein of 21 kDa
TcCLB.509237.10	-0,539	2,60E-09	mevalonate kinase, putative
TcCLB.507063.20	-0,537	1,44E-03	eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative
TcCLB.503891.40	-0,537	3,02E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507057.30	-0,537	2,64E-03	arginine N-methyltransferase, type I
TcCLB.511629.30	-0,537	2,45E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509575.30	-0,536	2,08E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507251.10	-0,536	1,21E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509235.20	-0,535	6,28E-07	C-5 sterol desaturase, putative
TcCLB.507767.10	-0,534	4,25E-08	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative
TcCLB.503987.60	-0,534	2,32E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511517.150	-0,533	8,30E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508045.30	-0,532	7,75E-05	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507967.30	-0,531	2,08E-04	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit k
TcCLB.506489.30	-0,530	6,56E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506201.110	-0,530	3,27E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511209.10	-0,529	2,14E-08	Vacuolar proton pump subunit B, putative
TcCLB.511855.20	-0,528	1,80E-06	ubiquitin-like protein, putative
TcCLB.509611.170	-0,527	1,91E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511859.30	-0,526	4,87E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.503815.10	-0,525	3,12E-08	alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative
TcCLB.508173.100	-0,524	1,93E-07	Monooxygenase, putative
TcCLB.510099.90	-0,524	7,45E-04	tyrosine phosphatase isoform, putative
TcCLB.508693.80	-0,523	1,11E-04	ruvB-like DNA helicase, putative
TcCLB.507519.164	-0,522	5,24E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507787.70	-0,522	9,53E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506435.390	-0,521	2,76E-04	mitochondrial ATP-dependent zinc metallopeptidase, putative
TcCLB.511287.110	-0,521	5,42E-06	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508153.164	-0,520	4,49E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.509179.180	-0,518	8,37E-04	zinc-finger protein ZPR1, putative
TcCLB.509795.89	-0,518	3,73E-03	phosphoprotein lepp12, putative
TcCLB.506297.340	-0,517	2,39E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508919.140	-0,517	1,25E-08	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit a
TcCLB.508153.730	-0,516	4,22E-09	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
TcCLB.508173.219	-0,516	2,62E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.506559.380	-0,512	1,30E-04	centrin, putative

TcCLB.506855.350	-0,512	3,95E-03	hypothetical protein
TcCLB.508177.129	-0,511	6,74E-08	cystathionine beta-synthase, putative
TcCLB.509569.120	-0,510	2,14E-05	RNA-binding protein, putative
TcCLB.509051.40	-0,510	2,25E-06	adenosine kinase, putative
TcCLB.508689.20	-0,510	4,26E-04	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g
TcCLB.507019.30	-0,508	5,78E-05	ribosome biogenesis regulatory protein (RRS1), putative
TcCLB.508177.110	-0,508	1,00E-08	cystathionine beta-synthase
TcCLB.510421.270	-0,507	3,77E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.508175.360	-0,507	1,87E-10	cystathionine beta-synthase
TcCLB.503823.84	-0,507	7,71E-04	DNA-directed RNA polymerase I subunit, putative
TcCLB.509611.160	-0,506	2,51E-04	proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative
TcCLB.511837.80	-0,504	2,51E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507615.70	-0,503	8,09E-05	deoxyhypusine hydroxylase, putative
TcCLB.510689.30	-0,503	1,10E-05	proteasome beta 7 subunit, putative
TcCLB.509945.24	-0,503	6,69E-03	hypothetical protein, conserved
TcCLB.511295.40	-0,503	6,37E-04	tRNA pseudouridine synthase A-like protein, putative
TcCLB.509799.90	-0,501	1,31E-04	hypothetical protein, conserved
TcCLB.507007.74	-0,501	5,58E-03	small nuclear ribonucleoprotein Sm-F, putative

## 7.5 Lista de términos GO de genes sobre-expresados

### FUNCIONES MOLECULARES

ATP binding	protein kinase, putative
	Serine/threonine-protein kinase NEK15, putative
	STE group serine/threonine-protein kinase, putative
	kinatase, putative
	SNF1-related protein kinases, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	arginine kinase
	cdc2-related protein kinase 4, putative
	tyrosine protein kinase, putative
	6-phosphofructo-2-kinase 1
	ATP-binding cassette protein subfamily G
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 2
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 1
	heat shock protein 85, putative
	heat shock protein 85, putative
	heat shock protein 85, putative
	Heat shock protein 83, putative
	NIMA-related kinase, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	MEKK-related kinase 1, putative
CMGC/DYRK protein kinase, putative	
STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative	
protein kinase, putative	

	protein kinase, putative
	protein kinase, putative
Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	protein kinase, putative
	Serine/threonine-protein kinase NEK15, putative
	STE group serine/threonine-protein kinase, putative
	kinatase, putative
	SNF1-related protein kinases, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	arginine kinase
	cdc2-related protein kinase 4, putative
	tyrosine protein kinase, putative
	poly(A) polymerase, putative
	6-phosphofructo-2-kinase 1
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 2
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 1
	phosphatidylinositol 3-kinase 2, putative
	NIMA-related kinase, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	MEKK-related kinase 1, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	protein kinase, putative
protein kinase, putative	
protein kinase, putative	

## COMPONENTES CELULARES

Intrinsic component of membrane	sugar transporter, putative
	ascorbate peroxidase, putative
	hexose transporter
	nucleobase transporter, putative
	protein associated with differentiation 8, putative
	ATP-binding cassette protein subfamily G
	hexose transporter, putative
	protein associated with differentiation 8, putative
	hypothetical protein, conserved

## PROCESOS BIOLÓGICOS

Protein phosphorylation	protein kinase, putative
	Serine/threonine-protein kinase NEK15, putative
	STE group serine/threonine-protein kinase, putative
	kinatase, putative
	SNF1-related protein kinases, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	cdc2-related protein kinase 4, putative
	tyrosine protein kinase, putative
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 2
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 1

	NIMA-related kinase, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	MEKK-related kinase 1, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	protein kinase, putative
	protein kinase, putative
	protein kinase, putative
Cellular protein modification process	dual specificity protein phosphatase or MAP kinase phosphatase, putative
	protein kinase, putative
	Serine/threonine-protein kinase NEK15, putative
	STE group serine/threonine-protein kinase, putative
	kinatase, putative
	SNF1-related protein kinases, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	cdc2-related protein kinase 4, putative
	tyrosine protein kinase, putative
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 2
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 1
	NIMA-related kinase, putative
	tubulin-tyrsoine ligase-like protein, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	MEKK-related kinase 1, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	dual-specificity protein phosphatase, putative
	protein kinase, putative
	protein kinase, putative
	protein kinase, putative
Phosphate-containing compound metabolic process	dual specificity protein phosphatase or MAP kinase phosphatase, putative
	protein kinase, putative
	Serine/threonine-protein kinase NEK15, putative
	STE group serine/threonine-protein kinase, putative
	cytidine triphosphate synthase, putative
	kinatase, putative
	SNF1-related protein kinases, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	cdc2-related protein kinase 4, putative
	tyrosine protein kinase, putative
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 2
	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 1
	receptor-type adenylate cyclase, putative
	NIMA-related kinase, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	MEKK-related kinase 1, putative
	CMGC/DYRK protein kinase, putative
	STE/STE11 serine/threonine-protein kinase, putative
	dual-specificity protein phosphatase, putative
	protein kinase, putative
	protein kinase, putative

	protein kinase, putative
--	--------------------------

## 7.6 Lista de términos GO de genes sub-expresados

### FUNCIONES MOLECULARES

RNA binding	eukaryotic translation initiation factor 1A, putative
	centromere/microtubule binding protein cbf5, putative
	guide RNA associated protein 1, putative
	U2 small nuclear ribonucleoprotein 16.5K, putative
	guide RNA-binding protein of 21 kDa
	pre-rRNA-processing protein PNO1, putative
	eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative
	nucleolar protein, putative
	ATP-dependent RNA helicase, putative
	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit j
	Eukaryotic translation initiation factor 1, putative
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g
	MRB1-associated protein, putative
	hypothetical protein, conserved
	fibrillarin, putative
	Gcd10p family, putative
	mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative
	fibrillarin, putative
	tRNA pseudouridine synthase A-like protein, putative
Lupus La protein homolog, putative	
eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	
phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative	
Translation initiation factor activity	eukaryotic translation initiation factor 1A, putative
	eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative
	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit j
	Eukaryotic translation initiation factor 1, putative
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g
NAD binding	Gcd10p family, putative
	malic enzyme, putative
	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative
D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative	

### COMPONENTES CELULARES

Membrane-bounded organelle	alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative
	DNA-directed RNA polymerase, putative
	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
	nucleosome assembly protein-like protein, putative

guide RNA associated protein 1, putative
ATP-dependent protease subunit HslV, putative
U2 small nuclear ribonucleoprotein 16.5K, putative
glucose-regulated protein 78, putative
guide RNA-binding protein of 21 kDa
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
NADH dehydrogenase, putative
NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I subunit, putative
ribosome biogenesis regulatory protein (RRS1), putative
nucleosome assembly protein, putative
PQQ-like domain/Protein of unknown function (DUF1620), putative
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative
phosphomevalonate kinase protein, putative
histone H4, putative
sphingosine-1-phosphate phosphatase, putative
ATP-dependent RNA helicase, putative
mitochondrial protein 99, putative
nucleosome assembly protein (NAP), putative
inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, putative
mRNA transport regulator MTR2, putative
peripherally associated ATOM36
cytochrome c oxidase assembly factor, putative
dolichyl-P-Man:GDP-ManGlcNAc2-PP-dolichyl beta-1,4-mannosyltransferase, putative
p22 protein precursor, putative
MRB1-associated protein, putative
3-ketoacyl-CoA reductase, putative
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
mevalonate kinase, putative
3-Beta-hydroxysteroid-delta(8), delta(7)-isomerase, putative
hypothetical protein, conserved
hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative
kinetoplast-associated protein
L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial, putative
Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme
hypothetical protein, conserved
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative
Mitochondrial import receptor subunit ATOM40, putative
AARP2CN (NUC121) domain/Protein of unknown function (DUF663), putative
delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
Vacuolar proton pump subunit B, putative
hypothetical protein, conserved
fibrillarlin, putative
Lupus La protein homolog, putative
signal peptidase type I, putative

Cytoplasmic part	alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative
	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
	deoxyhypusine synthase, putative
	guide RNA associated protein 1, putative
	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
	ATP-dependent protease subunit HslV, putative
	glucose-regulated protein 78, putative
	guide RNA-binding protein of 21 kDa
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
	NADH dehydrogenase, putative
	NADH-ubiquinone oxidoreductase complex I subunit, putative
	PQQ-like domain/Protein of unknown function (DUF1620), putative
	arginine N-methyltransferase, type I
	eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative
	succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit k
	sphingosine-1-phosphate phosphatase, putative
	mitochondrial protein 99, putative
	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, putative
	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
	peripherally associated ATOM36
	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
	cytochrome c oxidase assembly factor, putative
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit j
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g
	dolichyl-P-Man:GDP-ManGlcNAc2-PP-dolichyl beta-1,4-mannosyltransferase, putative
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit a
	p22 protein precursor, putative
	MRB1-associated protein, putative
	3-ketoacyl-CoA reductase, putative
	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
	mevalonate kinase, putative
	3-Beta-hydroxysteroid-delta(8), delta(7)-isomerase, putative
	hypothetical protein, conserved
	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative
	kinetoplast-associated protein
	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial, putative
	Bifunctional NAD(P)H-hydrate repair enzyme
	hypothetical protein, conserved
	Eukaryotic initiation factor 4A-1
mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative	
tryptophanyl-tRNA synthetase, putative	
Mitochondrial import receptor subunit ATOM40, putative	
delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative	

	Vacuolar proton pump subunit B, putative
	mevalonate-diphosphate decarboxylase, putative
	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
	signal peptidase type I, putative
Contractile vacuole	alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative
	ATP-dependent protease subunit HslV, putative
	glucose-regulated protein 78, putative
	NADH dehydrogenase, putative
	PQQ-like domain/Protein of unknown function (DUF1620), putative
	mitochondrial protein 99, putative
	p22 protein precursor, putative
	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
	hypothetical protein, conserved
	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial, putative
	hypothetical protein, conserved
	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
	Vacuolar proton pump subunit B, putative

## PROCESOS BIOLÓGICOS

Cellular biosynthetic process	asparagine synthetase a, putative
	DNA-directed RNA polymerase, putative
	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
	eukaryotic translation initiation factor 1A, putative
	DNA-directed RNA polymerase I subunit, putative
	oligosaccharyl transferase subunit, putative
	deoxyhypusine synthase, putative
	ATP-dependent protease subunit HslV, putative
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
	histidyl-tRNA synthetase
	eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative
	phosphomevalonate kinase protein, putative
	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, putative
	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
	glutamine synthetase, putative
	translation initiation factor 2 subunit, putative
	Eukaryotic translation initiation factor 1, putative
	dolichyl-P-Man:GDP-ManGlcNAc2-PP-dolichyl beta-1,4-mannosyltransferase, putative
	lysyl-tRNA synthetase, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
	mevalonate kinase, putative
	Gcd10p family, putative
	Eukaryotic initiation factor 4A-1
GPI alpha-mannosyltransferase III	
S-adenosylmethionine synthetase, putative	

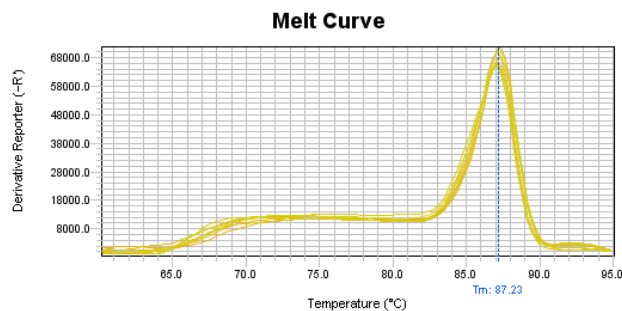
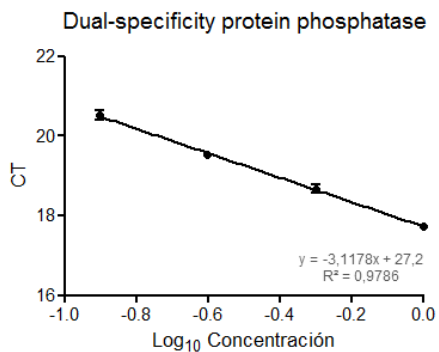
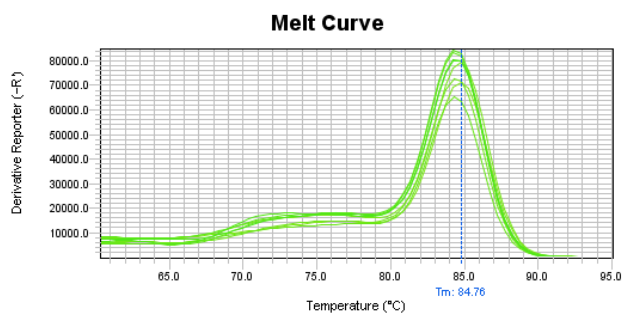
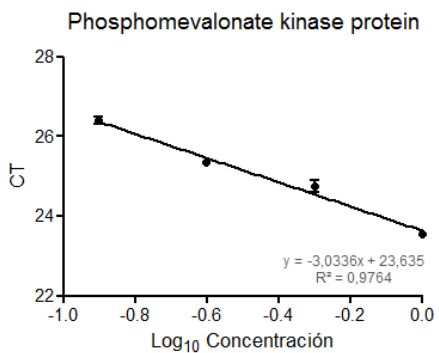
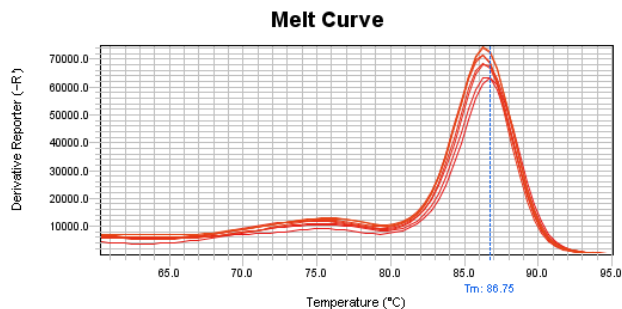
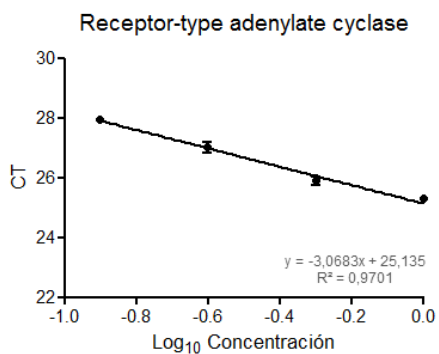


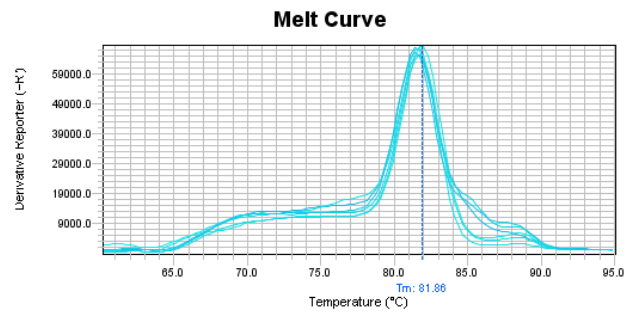
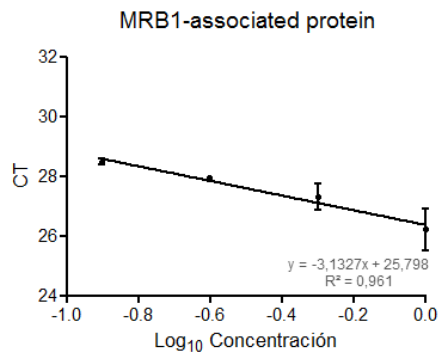
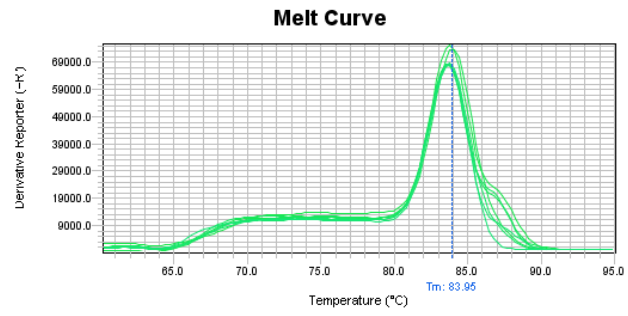
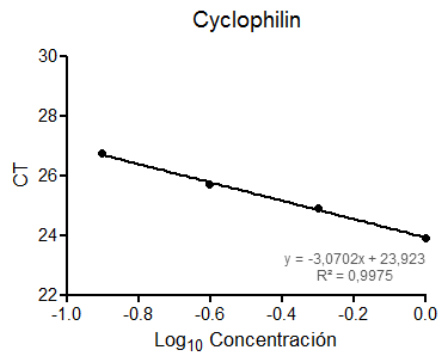
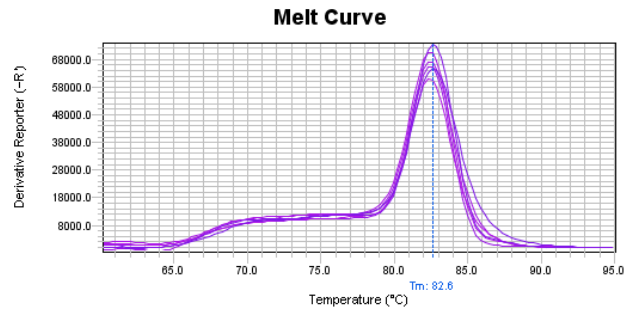
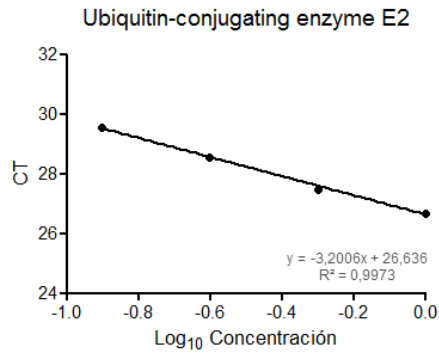
	tryptophanyl-tRNA synthetase, putative
	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
	mevalonate-diphosphate decarboxylase, putative
	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
	diphthine synthase, putative
	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
Single-organism biosynthetic process	asparagine synthetase a, putative
	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
	deoxyhypusine synthase, putative
	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
	phosphomevalonate kinase protein, putative
	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, putative
	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
	glutamine synthetase, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
	mevalonate kinase, putative
	GPI alpha-mannosyltransferase III
	S-adenosylmethionine synthetase, putative
	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
	mevalonate-diphosphate decarboxylase, putative
	diphthine synthase, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
Small molecule biosynthetic process	asparagine synthetase a, putative
	deoxyhypusine synthase, putative
	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
	phosphomevalonate kinase protein, putative
	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
	glutamine synthetase, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
Organic cyclic compound metabolic process	asparagine synthetase a, putative
	DNA-directed RNA polymerase, putative
	centromere/microtubule binding protein cbf5, putative
	DNA-directed RNA polymerase I subunit, putative
	guide RNA associated protein 1, putative
	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
	ATP-dependent protease subunit HslV, putative
	U2 small nuclear ribonucleoprotein 16.5K, putative
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative
	histidyl-tRNA synthetase
	Adenine phosphoribosyltransferase, putative
	nucleolar protein, putative
	phosphomevalonate kinase protein, putative
	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, putative
	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g
	lysyl-tRNA synthetase, putative

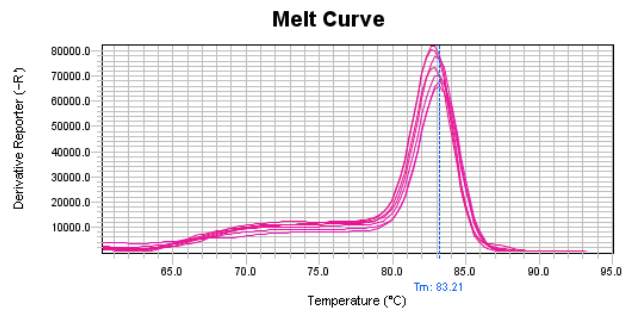
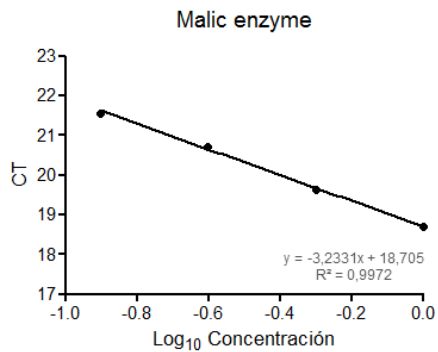
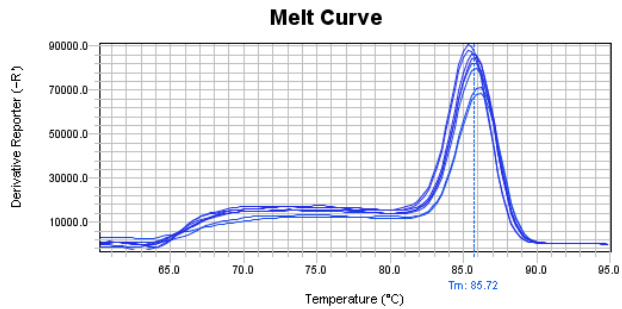
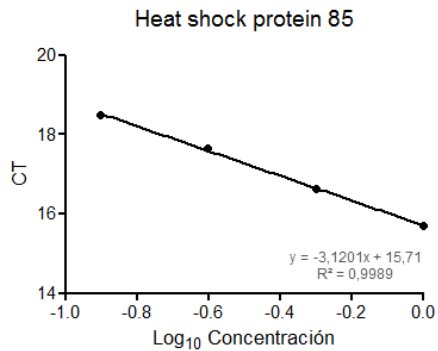
	CCCH zinc finger in TRM13 protein/U11-48K-like CHHC zinc finger/Methyltransferase TRM13, putative
	3-Beta-hydroxysteroid-delta(8), delta(7)-isomerase, putative
	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, putative
	fibrillarin, putative
	mitochondrial RNA binding complex 1 subunit, putative
	S-adenosylmethionine synthetase, putative
	tryptophanyl-tRNA synthetase, putative
	snoRNP protein GAR1, putative
	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
	Vacuolar proton pump subunit B, putative
	fibrillarin, putative
	tRNA pseudouridine synthase A-like protein, putative
	Lupus La protein homolog, putative
	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative
Carboxylic acid biosynthetic process	asparagine synthetase a, putative
	deoxyhypusine synthase, putative
	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
	glutamine synthetase, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
Organic substance biosynthetic process	C-5 sterol desaturase, putative
	asparagine synthetase a, putative
	DNA-directed RNA polymerase, putative
	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
	eukaryotic translation initiation factor 1A, putative
	DNA-directed RNA polymerase I subunit, putative
	oligosaccharyl transferase subunit, putative
	deoxyhypusine synthase, putative
	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase, putative
	ATP-dependent protease subunit HslV, putative
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
	histidyl-tRNA synthetase
	eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative
	phosphomevalonate kinase protein, putative
	inosine-adenosine-guanosine-nucleosidehydrolase, putative
	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha
	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative
	glutamine synthetase, putative
	Eukaryotic translation initiation factor 1, putative
	dolichyl-P-Man:GDP-ManGlcNAc2-PP-dolichyl beta-1,4-mannosyltransferase, putative
	lysyl-tRNA synthetase, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
	mevalonate kinase, putative
	Gcd10p family, putative
	Eukaryotic initiation factor 4A-1
	GPI alpha-mannosyltransferase III
	S-adenosylmethionine synthetase, putative
tryptophanyl-tRNA synthetase, putative	

	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, putative
	mevalonate-diphosphate decarboxylase, putative
	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3
	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha chain, putative
	C-5 sterol desaturase, putative
Cofactor binding	alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase, putative
	squalene monooxygenase, putative
	malic enzyme, putative
	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
	NADH dehydrogenase, putative
	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase, putative
	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein, putative
	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative
	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, putative

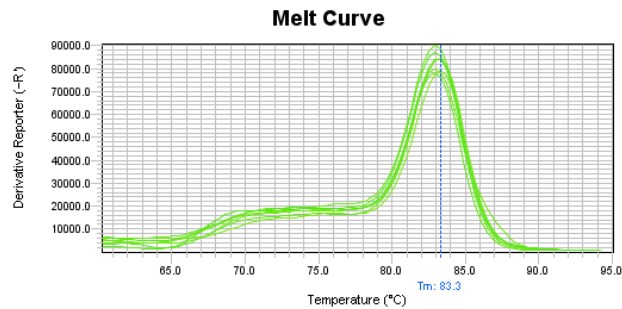
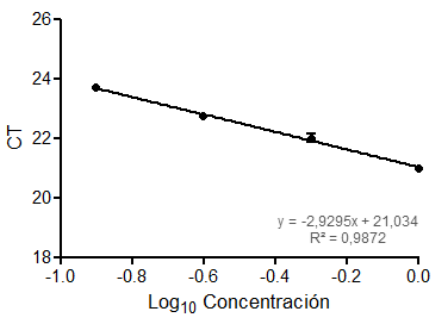
### 7.7 Curvas de eficiencia y de *melting* de los cebadores de RT-PCR



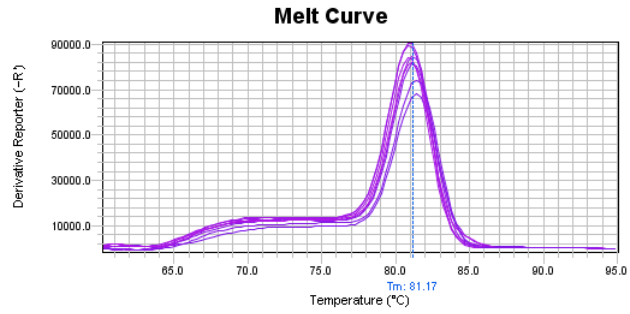
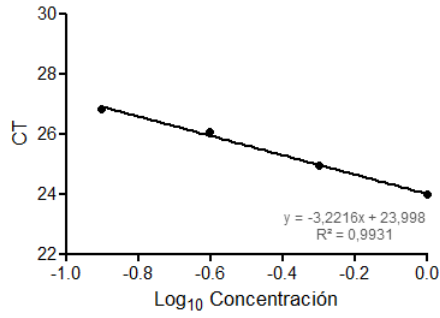




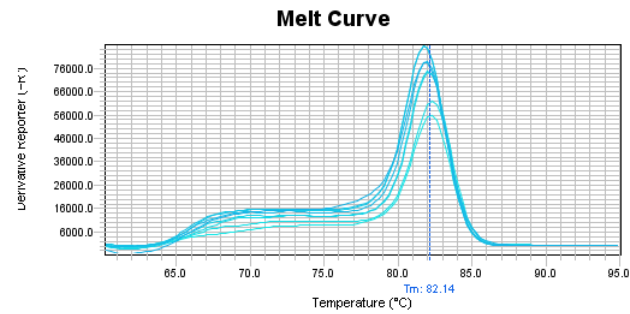
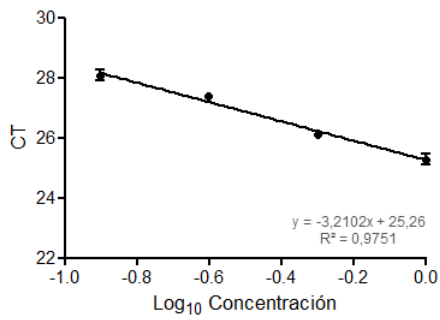
### Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3



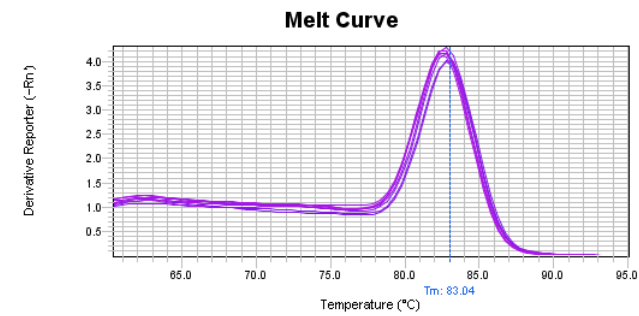
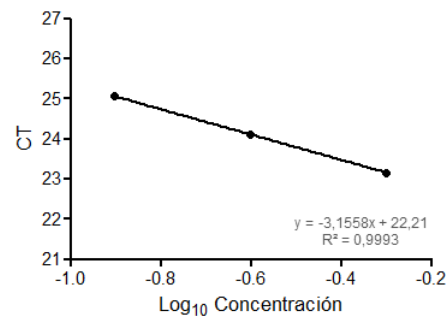
CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase



cAMP phosphodiesterase A



Cytochrome P450 reductase



Threonyl-tRNA synthetase

