



**Universidad del
Rosario**

**Comparación de los perfiles de expresión génica de una cepa asociada a un
presunto brote oral y un caso crónico de la enfermedad de Chagas**

Lina Sofía Velandia González

**Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Biología
Bogotá D.C., Colombia
2023**

Comparación de los perfiles de expresión génica de una cepa asociada a un presunto brote oral y un caso crónico de la enfermedad de Chagas

Lina Sofía Velandia González

Trabajo de grado para obtener el título de:

Bióloga

Directora:

Lissa Cruz Saavedra, Ph.D

Codirector:

Juan David Ramírez, Ph.D

**Universidad del Rosario
Facultad de Ciencias Naturales
Programa de Biología
Bogotá D.C., Colombia 2023**

Comparación de los perfiles de expresión génica de una cepa asociada a un presunto brote oral y un caso crónico de la enfermedad de Chagas

Lina Sofía Velandia¹, Lissa Cruz-Saavedra¹, Juan David Ramírez^{1,2*}

¹Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología-UR (CIMBIUR), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.

²Molecular Microbiology Laboratory, Department of Pathology, Molecular and Cell-Based Medicine, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.

*corresponding autor: juand.ramirez@urosario.edu.co

Resumen

Trypanosoma cruzi es el causante de la enfermedad de Chagas (CD). Los brotes orales de CD han aumentado en los últimos años, y las cepas causantes de estos se han asociado a una sintomatología aguda y mayor mortalidad. En estos brotes, el parásito expresa proteínas de familias multigénicas como la transialidasa gp82; no obstante, no se ha observado la remodelación transcriptómica que puede llevar a cabo una cepa asociada a Chagas oral. Por lo anterior, en este estudio se comparó la remodelación transcriptómica del parásito de una cepa aislada de un presunto brote oral (JJ21) y de una cepa aislada de caso crónico (MG) de CD en un modelo de infección de fibroblastos, a las 24 y 72 horas post-infección. Para ello, se analizó el transcriptoma de ambas cepas, y se evidenció los genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés), ontologías génicas y vías diferencialmente expresadas gracias a TriTrypDB y KAAS. Se encontró que en la cepa JJ21 a las 24 horas se subexpresaron DGF-1, GP63 y Ts, mientras que se sobreexpresaron las TsII, TsV, MASP y TcMUCII. A las 72 horas, en la cepa JJ21 se subexpresaron DGF-1, GP63 y TcMUCII, y que se sobreexpresaron las TcMUC. Adicionalmente, a las 72 horas de la cepa JJ21 se sobreexpresaron procesos catabólicos. De la misma manera, se reconstruyó la vía de los ribosomas para la cepa JJ21, lo que sugiere la expresión diferencial de transcritos de proteínas ribosómicas entre cepas. En conclusión, en la cepa presuntamente asociada a un brote oral se logró determinar que existe un cambio en la expresión diferencial asociada a transcritos de proteínas de ribosomas y de familias multigénicas de proteínas. Las diferencias encontradas son el primer paso para entender los cambios entre cepas con distintos mecanismos de infección a un nivel de remodelación transcriptómica.

Abstract

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease (CD). Oral outbreaks of CD have increased in recent years, and the strains responsible for these outbreaks have been associated with acute symptoms and higher mortality rates. In these outbreaks, transcripts from multigene families such as transialidase gp82 are expressed. However, no transcriptomic remodeling has been observed in an oral Chagas strain. This study aimed to compare the transcriptomic remodeling in the parasite in a strain isolated from a suspected oral outbreak (JJ21) and a strain isolated from a chronic case (MG) of Chagas disease in a fibroblast infection model, at 24- and 72-hours post-infection. The transcriptome of both strains was analyzed, and differential expressed genes (DEGs), gene ontologies, and differentially expressed pathways were identified using TriTrypDB and KAAS. DGF-1, GP63, and Ts were downregulated in the JJ21 strain at 24 hours, while TsII, TsV, MASP, and TcMUCII were upregulated. At 72 hours, DGF-1, GP63, and TcMUCII were downregulated in the JJ21 strain and TcMUC was upregulated. Additionally, at 72 hours in the JJ21 strain, catabolic processes were overexpressed. Similarly, the ribosome pathway was reconstructed for the JJ21 strain, suggesting differential expression of ribosomal transcripts between strains. In conclusion, the oral outbreak strain has changes in expression of transcripts from ribosomal proteins and multigene protein families. The differences found are the first step towards understanding the transcriptomic remodeling in strains with different infection mechanisms.

Palabras clave

Trypanosoma cruzi, transcriptómica, genes diferencialmente expresados, brote oral

Keywords

Trypanosoma cruzi, transcriptomics, differential expressed genes, oral outbreak

1. Introducción

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas (CD) (OPS, 2023). En el mundo existen aproximadamente 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi*, de estas solo 30% son diagnosticables y se presume que 30% desarrollará sintomatología crónica (Lidani et al., 2019; OPS, 2023). La enfermedad de Chagas afecta principalmente a América

Latina; se estima que 75 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (OPS, 2023). En Colombia hay aproximadamente 437.000 personas infectadas con *T. cruzi* y alrededor 12 millones de habitantes están en riesgo de infectarse (INS, 2022, 2019).

T. cruzi es principalmente transmitido por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (OPS, 2023). La infección de este parásito también puede ocurrir por vía congénita o vertical, transfusión de sangre, trasplante de órganos, accidentes de laboratorio y consumo de alimentos contaminados con heces que contengan al parásito (WHO, 2023). Esta enfermedad cuenta con una fase aguda y una fase crónica. La fase aguda ocurre inmediatamente después de la infección y se manifiesta durante las semanas siguientes; esta se caracteriza por síntomas como chagoma de inoculación, fiebre, diarrea, entre otros, en algunos casos se genera agrandamiento en el corazón. En la fase crónica de CD, las personas infectadas permanecen asintomáticas durante años, no obstante, pueden desarrollar miocarditis chagásica, megacolon, aneurisma apical y otros problemas potencialmente mortales (CDC, 2019; Organización Panamericana de la Salud OPS, 2023).

T. cruzi cuenta con un complejo ciclo de vida pues presenta diferentes estadios morfológicos: tripomastigote metacíclico (MT), amastigote (AM), tripomastigote derivado de célula (TDC) y epimastigote (EP) (Teixeira et al., 2012). El ciclo inicia cuando las heces del vector triatomo contaminadas con MT entran por el torrente sanguíneo del mamífero a través de una laceración provocada por la misma picadura o por otra causa; igualmente, los MT pueden ingresar por vía oral, donde infectan inicialmente la mucina gástrica. Los MT de *T. cruzi* tienen la capacidad de interactuar con la mayoría de células nucleadas del hospedero, entre estas macrófagos, células musculares, epiteliales, y neuronas (Covarrubias et al., 2007; Teixeira et al., 2012). Dentro del hospedero, el parásito se transforma de MT en AM, y posteriormente, tras lisis de la vacuola parasitófora se multiplican en el citoplasma y se convierten en TDC, quienes diseminan la infección a través de los vasos linfáticos y el torrente sanguíneo hacia sitios distales donde experimentan ciclos adicionales de multiplicación intracelular (Cruz-Saavedra, Vallejo, et al., 2020; Teixeira et al., 2012). El ciclo continúa cuando los vectores triatominos consumen sangre periférica con TDC de un mamífero infectado. En el vector, los TDC de *T. cruzi* se diferencian en EP que proliferan en el intestino medio, y migran a la ampolla rectal donde se diferencian nuevamente los MT que se eliminan en las heces de los insectos (Cruz-Saavedra, Vallejo, et al., 2020; Teixeira et al., 2012; Velásquez-Ortiz & Ramírez, 2020).

En relación con la transmisión, la vía vectorial es la más frecuente en el mundo, sin embargo, el consumo de alimentos o agua contaminados con MTs ha causado diferentes brotes de Chagas oral desde su primer reporte en 1965 (Da Silva *et al.*, 1968). Desde entonces se han informado casos en Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa y Venezuela (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). En Colombia, la transmisión oral tiene gran incidencia, de hecho, genera aproximadamente el 50% de los brotes totales del territorio; además, en el año 2019, la mortalidad de la enfermedad aumentó a 7,9% debido a estos brotes, esta tasa es mayor a la del dengue o malaria (Instituto Nacional de Salud INS, 2019). También, la población expuesta a la infección mediante esta vía asciende a los 9 millones de personas de las cuales 45% habitan en el área rural (INS, 2022).

Algunos autores sugieren características únicas en relación con la virulencia presente en las cepas involucradas en los brotes de Chagas oral, estas le permiten a *T. cruzi* pasar por ambientes hostiles como el pH ácido del estómago, evadir el sistema inmune, y establecer una infección que puede llevar a la severidad en periodos de tiempo relativamente cortos (Cortez *et al.*, 2012; Franco-Paredes *et al.*, 2020). Por ejemplo, la capacidad de infección de cuando se consumen MTs vía oral, está asociada con la interacción de estos con la mucina gástrica y las células epiteliales subyacentes, esto gracias a la unión de la proteína de superficie específica gp82 (Bayer-Santos *et al.*, 2013; Staquicini *et al.*, 2010). Por otro lado, a diferencia de la infección transmitida por vectores, la sintomatología de CD causado por consumo depende de la carga parasitaria; esta se caracteriza por ser alta en los brotes orales (Alarcón de Noya *et al.*, 2016; Lewis *et al.*, 2018), Además, en los brotes orales se suele presentar sintomatología aguda e inflamación del músculo cardíaco (Filigheddu *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2022); y presenta periodos de incubación más cortos (Franco-Paredes *et al.*, 2020; Nunes *et al.*, 2018).

Se cree que las proteínas de familias multigénicas tienen funciones en la interacción hospedero-patógeno, la invasión y virulencia (Leão *et al.*, 2022; Osorio *et al.*, 2012; Ramírez, 2023; Yao, 2010). Las metaloproteasas (GP63) se expresan diferencialmente durante los estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* (Osorio *et al.*, 2012); aún no se conoce su función, sin embargo, en leishmaniasis desempeña una función en la patogenia y en *T. brucei* participa en la diferenciación del estadio procíclico (Osorio *et al.*, 2012; Yao, 2010). Así mismo, las proteínas similares a la mucina (MASP) tienen un alto grado de polimorfismo y se expresan diferencialmente dentro de la misma población

de parásitos (Bartholomeu et al., 2009; Leão et al., 2022). Por lo anterior, se esperaría evidenciar las MASP y las GP63 diferencialmente expresada entre las cepas. Adicionalmente, las transialidasas (Ts) transfieren ácido siálico de la célula hospedera a los ligandos de superficie como las mucinas (TcMUC), función necesaria en la invasión (Magalhães et al., 2022). En el grupo II de las Ts se encuentra la proteína gp82, la cual permanece inalterada por los jugos gástricos y puede translocar la mucina gástrica, lo que le permite iniciar la infección a través de las células del epitelio (Franco-Paredes et al., 2020; Oliveira et al., 2023). Por ello, las TsII se pueden sobreexpresar en cepas asociadas a Chagas oral. Finalmente, las Ts y la familia de genes dispersos (DGF-1) cumplen con funciones de evasión de la respuesta inmune del hospedero (Eugenia Giorgi & de Lederkremer, 2011; Kawashita et al., 2009; Ramírez, 2023), esto podrían significar una expresión diferencial avanzada la infección.

La transcriptómica ha permitido entender la interacción hospedero-patógeno de *T. cruzi*, permitiendo identificar la expresión diferencial génica del parásito en diferentes momentos de la infección y entre la infección por distintas cepas (Houston-Ludlam et al., 2016). De la igual modo, se ha observado la amplia remodelación del transcriptoma durante la infección temprana, y se ha sugerido que este proceso guía el desarrollo del parásito (Li et al., 2016). Además, las técnicas de transcriptómica han revelado cómo diferentes transcritos de la superficie de *T. cruzi* remodelan su expresión en todos los estadios de vida y durante metaciclologénesis (Cruz-Saavedra, Vallejo, et al., 2020; Cruz-Saavedra et al., 2023; Grisard et al., 2010; Sabalette et al., 2023). Por ello, el uso de técnicas de transcriptómica permitiría evaluar escenarios de expresión génica en las cepas de *T. cruzi* relacionadas con brotes orales, permitiendo observar la remodelación transcriptómica que pueden llevar a cabo estas cepas, y aclarando el panorama de la fisiopatología de CD, en especial teniendo en cuenta que hasta el momento ningún estudio se ha enfocado en este problema de interés en salud pública.

Estudios previos han demostrado la expresión diferencial génica entre cepas de distintas DTUs de *T. cruzi* (Houston-Ludlam et al., 2016), sin embargo, el análisis en los cambios de perfiles de expresión génica entre cepas ha sido limitado. Por ende, se hace necesario caracterizar el perfil transcriptómico de cepas aisladas de brotes de Chagas oral, esto significaría un aporte para el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad de Chagas. Por lo tanto, en este estudio se

comparó el perfil transcriptómico de una cepa aislada de un presunto brote de transmisión oral y de una cepa aislada de caso crónico.

2. Métodos

Infección de fibroblastos

Las cepas MHOM/CO/04/MG (MG) y MHOM/CO/21/JJ21 (JJ21) fueron aisladas a partir de un caso crónico y de un supuesto brote oral, respectivamente. MG se ha reportado como caso doméstico, y el presunto caso de Chagas oral fue aislado en 2021 de un paciente pediátrico del área rural de Antioquia que presentaba sintomatología (Cruz et al., 2015; Gual-Gonzalez et al., 2022). Los fibroblastos L929 fueron escogidos por su utilidad en modelos de interacción hospederoparásito (Houston-Ludlam et al., 2016; Li et al., 2016); estos fueron infectados con una proporción de 10 parásitos por célula con MT de cada cepa en cajas de 25 cm³. Los MTs se obtuvieron mediante un cultivo envejecido de EP en medio LIT suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) en cajas de 25 cm³, seguidos de una purificación mediante una cromatografía en Sefarosa-DEAE siguiendo el protocolo descrito por Cruz-Saavedra *et al.*, 2017. Gracias a este cultivo se obtuvieron TDC que fueron utilizados para el ensayo.

Un total de 10 TDC por cepa se cuantificaron mediante el citómetro de flujo Guava EasyCyte (Millipore) (https://www.emdmillipore.com/US/en/20130828_204340?bd=1) siguiendo las instrucciones de fábrica. Posteriormente, se tripsinizaron los cultivos de fibroblastos y se realizó el conteo celular siguiendo el mismo protocolo de citometría con un ajuste al tamaño de parásito. Un total de 3x10⁴ células en medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) suplementados con 10% SFB se dispensaron en placas de 24 pozos y se esperó 4 horas a que se encontraran fijadas. Para el cultivo, se lavaron los fibroblastos, y se adicionaron 10 TDC por célula que se llevaron a incubar a una temperatura de 37°C en un ambiente de 5% de CO₂; se incluyeron 3 réplicas técnicas para la cepa MG y 6 para JJ21. Se realizó el seguimiento del cultivo a las 24, 48, 72 y 120 horas post infección mediante una coloración de Giemsa, lo anterior con el fin de corroborar si las cepas seguían los tiempos establecidos por Li *et al.*, 2016, de inicio de infección y punto máximo de AM. Se pararon los experimentos de tres réplicas de cada cepa a las 24 horas, las otras tres réplicas de la cepa JJ21 se pararon a las 72 horas; esto con la finalidad de realizar dos comparaciones: entre las cepas JJ21 y MG a las 24 horas, y entre las 24 y 72 horas de la cepa de supuesto brote oral. Transcurrido este tiempo, se lavaron las células, seguido de una tripzinización y centrifugación de

estas, finalmente, se realizaron dos lavados con PBS. Los pellet obtenidos fueron utilizados para la extracción.

Extracción de ARN

Con los pellet obtenidos se extrajo el ARN con el RNeasy Mini Kit (Qiagen, EE. UU.) siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad y la concentración de las muestras se comprobaron mediante el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EE. UU.); se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% para determinar la integridad. Todas las muestras tenían una relación 260/280 superior a ~2,0.

Secuenciación del ARN

Se realizaron tres réplicas biológicas para cada muestra: la cepa MG a las 24 horas, la cepa JJ21 a las 24 horas y una cepa más de JJ21 a las 72 horas (Tabla S1). El material genético seleccionado (ARN) presenta alta labilidad, al tener tres experimentos diferentes, las muestras se consideran réplicas biológicas. El modelo de infección (fibroblastos y parásitos) se secuenciaron con el sistema NovaSeq X-Ten (Illumina) de Novogene Bioinformatics Technology Co., Ltd, Beijing, China, con profundidad mínima de 9Gb. Los fibroblastos son quienes contribuyen mayoritariamente a las lecturas obtenidas pues la cantidad de parásitos intracelulares es baja. Los fragmentos de ADN se repararon, formaron una cola A y se ligaron adicionalmente con el adaptador Illumina. La biblioteca de ADN final se obtuvo por selección de tamaño y amplificación por PCR, con la finalidad de realizar librerías paired-end de 150 pb. Las bibliotecas a ARNm se generaron a partir de los dos tiempos de infección de la cepa JJ21 y a las 24 horas de la cepa MG. Para garantizar la calidad en el análisis, las lecturas que contenían adaptadores con un N>10% y Qscore<5 no fueron tenidas en cuenta. La calidad de las lecturas se evaluó con el software FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) que considera 10 parámetros, entre estos se encuentran la puntuación de calidad por base, el contenido de GC por secuencia de base y el contenido de Kmer.

Análisis de datos de transcriptoma

Las secuencias se alinearon contra la referencia de *T. cruzi* BrazilA4 versión TriTrypDB-63_TcruziBrazilA4 disponible en TripTrypDB (<http://tritrypdb.org>) (Aurrecoechea et al., 2017; Shanmugasundram et al., 2023). Para el análisis de expresión diferencial se utilizaron STAR v.2.5.2

para el alineamiento (Dobin et al., 2013) y el software HTSeq v.2.0.3 para el recuento de lecturas por gen (Putri et al., 2022). También, se utilizó DESeq2 v.1.18.1 para normalizar los recuentos de lectura y evaluar la significancia estadística de los genes diferencialmente expresados (DEG); los cuales fueron evaluados bajo los siguientes criterios: $\text{fold-change} \geq 2$ y p-value de Benjamini-Hochberg $< 0,05$ (Love et al., 2014). Las comparaciones del estudio utilizadas para DESeq se encuentran disponibles en la Tabla S1.

Con Microsoft Excel 2021 (18.0) se depuraron las listas de los DEGs en sub-regulado y sobre-regulados (Tabla S2) y se sometieron a una búsqueda de genes con TriTryp de EupathDB (Aurrecoechea et al., 2017). Esto permitió observar las ontologías génicas para las comparaciones (Tabla S3) y el enriquecimiento de las vías metabólicas (Tabla S4). Se crearon gráficos descriptivos sobre la expresión diferencial y la ontología génica utilizando Rstudio 3.3.0 con los paquetes ggplot2, gplots y tidyverse.

Además, se descargaron archivos fasta de los DEGs utilizando la herramienta TripTryp, los cuales fueron utilizados como entrada en el Servidor de Anotación Automática de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KAAS, por sus siglas en inglés) (Moriya et al., 2007). Se utilizó el algoritmo de búsqueda de homología GHOSTX con el conjunto de datos disponible de Kinetoplastids como referencia. KAAS anotó los genes a partir de las secuencias de los archivos fasta al alinearlos con las bases de datos disponibles en Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG, por sus siglas en inglés). Esto permitió la reconstrucción de vías de señalización en donde estaban involucrados los DEGs. El archivo HTML generado permitió observar los genes que participaron en las vías de señalización diferencialmente expresadas. Finalmente, las imágenes de las vías fueron editadas con Adobe Illustrator.

3. Resultados

Expresión diferencial de genes durante la infección en fibroblastos

Se obtuvieron entre 70 y 100 millones de lecturas para cada una de las 9 muestras incluidas en el estudio (3 muestras de MG a las 24 horas, 3 muestras de JJ1 a las 24 horas y 3 muestras de JJ21 a las 72 horas). Los resultados para cada réplica están disponibles en la Tabla S2. Se observó una expresión génica diferencial a las 24 horas entre las cepas MG y JJ21. La distribución de las lecturas basada en el fold change (FC) (> 2) y el valor p ($< 0,05$) para estas comparaciones se muestra en la

Figura 1. El fold change es una medida que describe el cambio entre la medida control y la experimental.

Se asignaron 1268 transcritos en la cepa JJ21 a las 24 horas, de estos 876 se subexpresaban y 54 se sobreexpresaban. Así mismo, en la cepa JJ21 a las 72 horas se asignaron 2587, de estos 787 estaban subexpresados y 93 sobreexpresados (Figura 1); esta muestra fue transcripcionalmente más activa. La cepa con mayor número de genes sobreexpresados fue MG a las 24 horas con un total de 876. La información completa de los genes diferencialmente expresados se puede encontrar en la Tabla S3.

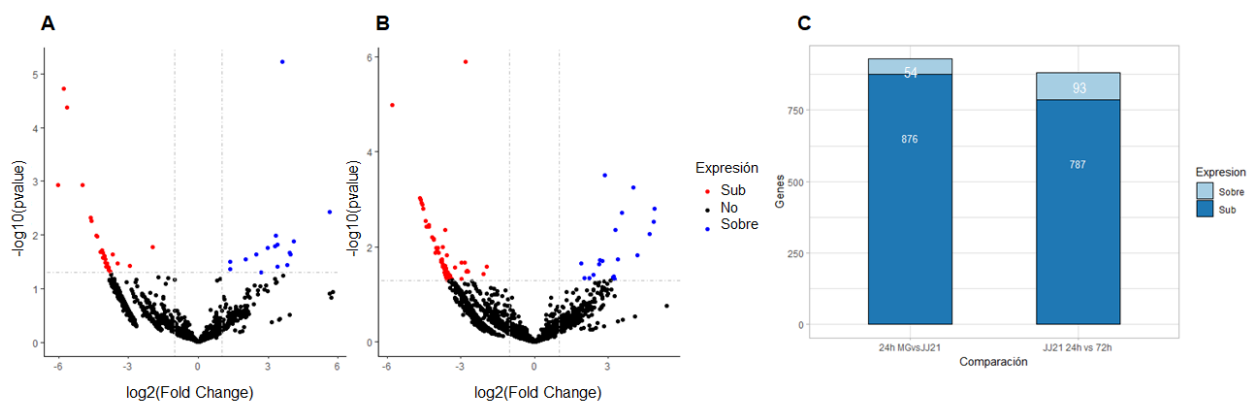


Figura 1. Gráfico de volcán para a) la comparación de las dos cepas en la infección temprana y b) la comparación de la cepa JJ21 en los dos distintos momentos post-infección, con la distribución de las lecturas con $-1.0 > \log_2\text{FoldChange} > 1.0$ y $\text{pvalue} > 0.05$. c) Abundancia de los DEGs para ambas comparaciones.

Para la evaluación de la remodelación transcripcional entre las cepas JJ21 y MG a las 24 horas, se observaron 294 genes sobrerregulados y 1428 genes subregulados (Figura 1c, Tabla S3). El transcrito más subregulado fue una cadena pesada de dineína con un FC de -6.03 , mientras que el más sobrerregulado fue la mucina con un FC de 5.40 . En esta comparación, se observó que en JJ21, los genes DGF-1, Transialidasa, Ts grupo V, GP63 y mucina TCMUII fueron principalmente subregulados. Además, en la cepa JJ21 a las 24 horas se sobreexpresó DGF-1, MASP, TS y TS grupos II y V (Figura 2A). Los transcritos más subregulados y sobrerregulados fueron genes que codificaban para proteínas hipotéticas con 188 y 49 copias, respectivamente. Entre los transcritos subregulados, los que tenían el menor número de copias (3) fueron la proteína de unión al ARN y la Ts del grupo V, y en cuanto a los transcritos sobrerregulados los de menor FC fueron MASP y las Ts de los grupos II y V, que tenían una copia cada una.

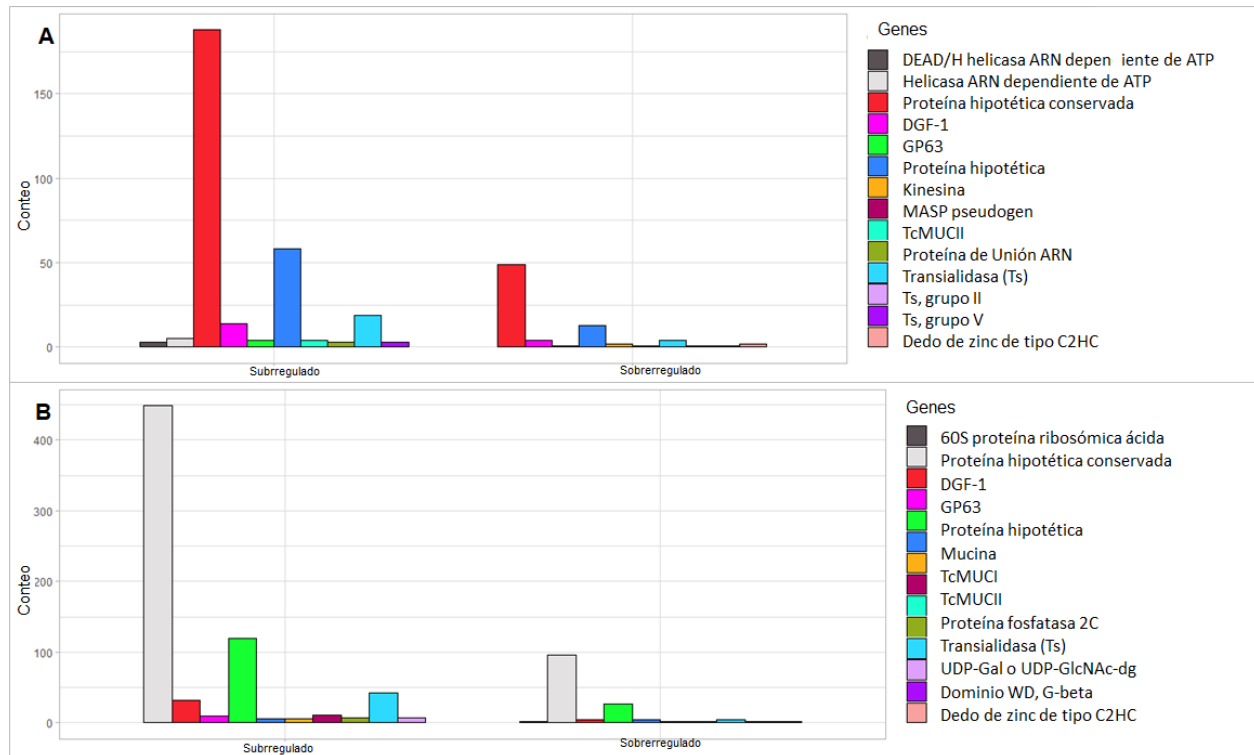


Figura 2. Abundancia de DEGs para a) la comparación de las 24 horas de ambas cepas b) la comparación de la post-infección de la cepa JJ21.

Por otro lado, la evaluación de la expresión diferencial de la cepa JJ21 a las 72 horas mostró que había 152 genes sobrerregulados y 623 subregulados (Figura 1c, Tabla S3), además, que los transcritos de proteínas hipotéticas tenían FC más bajo (-6.03), mientras que la proteína de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC) tenía el FC más alto (5.77). Los transcritos subexpresados estaban principalmente asociados con las familias de genes DGF-1, GP63, mucina, TcMUCI y TcMUCII. En contraste, los genes sobreexpresados incluían DGF-1, transialidasas y la proteína fosfatasa 2C (Figura 2B). En este caso, los transcritos más sobre y subregulados fueron genes que codificaban para proteínas hipotéticas con 449 y 96 copias, respectivamente. Entre los subregulados, la mucina tenía el menor número de copias (6), mientras que para los transcritos sobrerregulados, la proteína fosfatasa 2C y la proteína ácida ribosomal 60S tenían dos copias cada una. El número de copias para los genes diferencialmente expresados está disponible en la Tabla S4.

Ontología génica

El análisis de los genes diferencialmente expresados permitió revelar 105 transcritos asignados a ontologías génicas para la comparación de las dos cepas a las 24 horas, de estos 60 eran sobrerregulados y 45 subrregulados. Se observó que principalmente se sobreexpresaron transcritos asociados a procesos celulares (45 genes), de expresión génica (12 genes) y a procesos de biosíntesis celular de compuestos nitrogenados (11 genes) (Figura 3a), y se subexpresaron transcritos del metabolismo de sustancias orgánicas (108 genes), de compuestos nitrogenados (98 genes) y de macromoléculas celulares (95 genes) (Figura 3B).

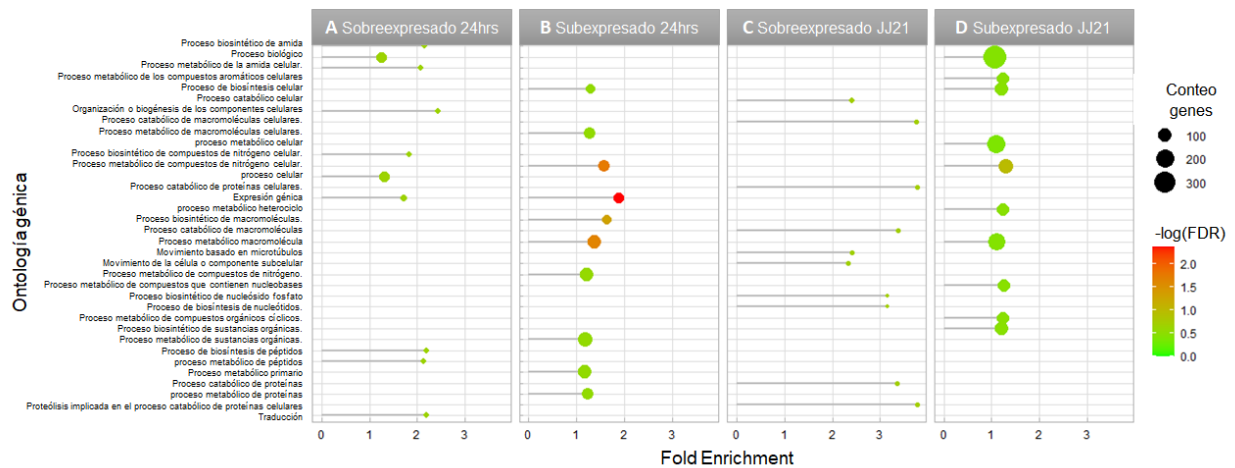


Figura 3. Ontología génica según la cantidad de transcritos, el fold enrichment y $-\log_{10}(\text{FDR})$ de a) Sobrerregulados de la comparación de la infección temprana, b) subrregulados de la comparación de la infección temprana, c) sobrerregulados de la cepa JJ21 en los dos momentos de la infección y d) subrregulados de la cepa JJ21 en los dos momentos de la infección.

De igual manera, fueron identificadas 177 transcritos asociados a ontologías génicas para la comparación de la cepa JJ21 a las 24 y 72 horas, de las cuales 97 eran subrregulados y 80 sobrerregulados. En esta cepa, se sobrerregularon transcritos de procesos catabólicos celulares (9 genes) y de macromoléculas (7 genes) (Figura 3C), y se subregularon transcritos asociados a procesos biológicos (351 genes), metabolismo celular (208 genes), de macromoléculas (175 genes) y de compuestos celulares nitrogenados (121 genes) (Figura 3D). La información completa de todas las ontologías génicas para todas las comparaciones se encuentra disponible en la Tabla S5.

Vías de señalización diferencialmente reguladas

Para determinar las vías de señalización asociadas con los genes diferencialmente expresados (DEGs), se utilizaron los resultados de TriTrypDB, que incluían información sobre la vía de

señalización, el número de DEGs, el fold enrichment y el FDR. En general, en la comparación de ambas cepas a las 24 horas fue posible observar que la cepa JJ21 se sobreexpresaban transcritos distintos a los sobre y subregulados en las otras comparaciones. Por el contrario, se evidenciaron similitudes en los transcritos subexpresados en la cepa JJ21 a las 24 horas y a las 72 horas (Figura 4).

En la comparación de la infección temprana entre las dos cepas a las 24 horas, se identificaron transcritos sobreexpresados para las siguientes vías: metabolismo de fármacos y otras enzimas, la supervía del metabolismo energético anaeróbico (invertebrados), el ciclo de asimilación de carbono fotosintético C4 (tipo NAD-ME), el metabolismo energético anaeróbico (invertebrados, citosol) y la biosíntesis de rizocitina A y B. De manera similar, se encontraron transcritos subexpresados de las siguientes en esta comparación: biosíntesis de carbapenem, biosíntesis de nucleótidos de azúcares del antígeno O, supervía de biosíntesis del complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano, metabolismo de almidón y sacarosa, y metabolismo de fármacos y otras enzimas (Figura 4).

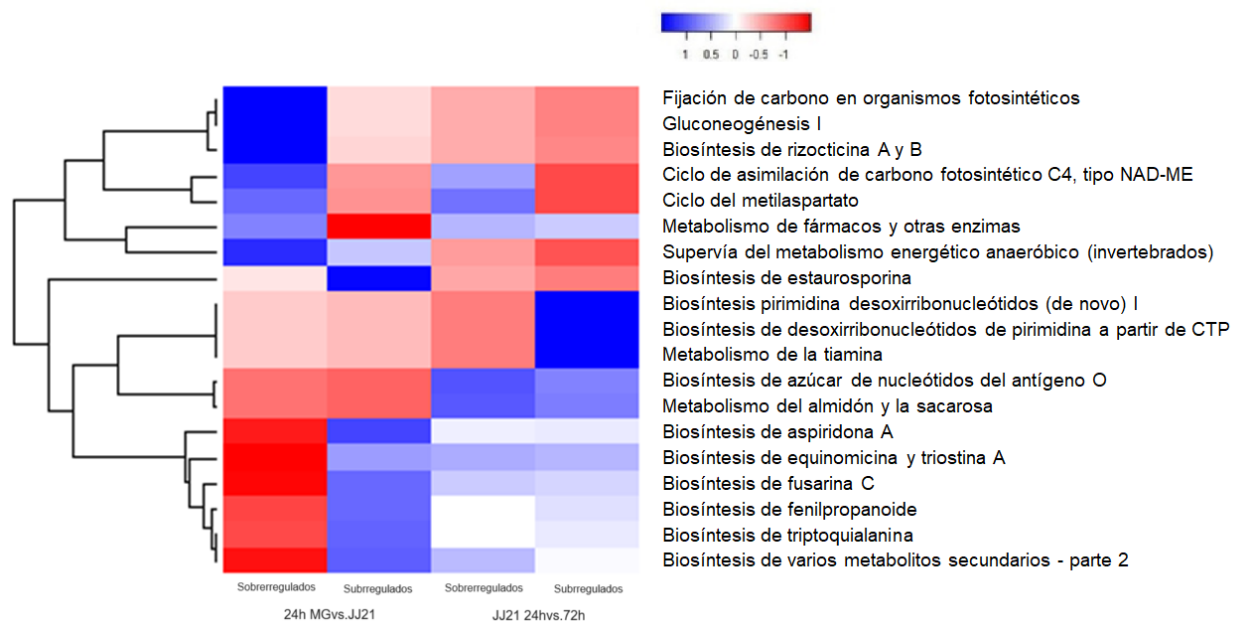


Figura 4. Mapa de calor del top 10 vías de señalización con más transcritos expresados en las comparaciones evaluadas.

Para la comparación de la infección a las 24 y 72 horas por JJ21, se evidenció que las vías más sobrerreguladas fueron procesos de biosíntesis de aspiridona A, de triptoquialanina, de fusarina C,

Figura 5. a) Vía del ribosoma expresada diferencialmente para las comparaciones de 24 horas entre ambas cepas, y aumentada en la cepa JJ21 a las 72 horas. Imagen adaptada de KAAS por KEGG. b) Tabla basada en genes regulados hacia arriba y hacia abajo para cada comparación.

De manera similar, en JJ21 a las 72 horas, se encontraron 9 genes subregulados asociados con el metabolismo de las purinas (Figura S2), y 10 genes subregulados asociados con la Glucólisis/Gluconeogénesis (Figura S3).

4. Discusión

El propósito de este estudio fue determinar la expresión diferencial de genes de una cepa aislada de un presunto brote de transmisión oral y un caso crónico. Para este fin se usó un modelo de infección de fibroblastos con TDC de *T. cruzi* y se evaluó la remodelación transcriptómica de la cepa de presunto brote oral, utilizando como control a la cepa de caso crónico. El transcriptoma fue secuenciado para identificar los DEGs, este análisis proporciona un medio sólido y sensible en la evaluación de la expresión diferencial. Adicionalmente, gracias a los DEGs fue posible identificar las ontologías génicas y las vías metabólicas diferencialmente expresadas. Las transalidasas del grupo II se sobreexpresaron en la cepa JJ21, este grupo se ha relacionado con la infección por vía oral por su afinidad con la mucina gástrica, lo que reafirma el papel que estas tienen en la infección del epitelio gástrico. Además, se observó que los genes GP63 que cumplen con funciones de virulencia en otras cepas de *T. cruzi*, se regulan a la baja en la cepa del supuesto brote de Chagas oral, lo que indica que en cepas como JJ21 existen otros genes que codifican para las funciones de virulencia. Teniendo en cuenta lo anterior, se evidencia que la cepa aislada de un supuesto brote de Chagas oral expresa un perfil transcriptómico distinto al brote de CD crónico.

Mediante el recuento de lecturas, se evidenció mayor actividad transcriptómica en la cepa JJ21 a las 72 horas cuando se compara con la misma cepa a las 24 horas. Esto se debe al aumento en la cantidad de parásitos durante la infección. Adicionalmente, los transcritos más subexpresados y sobreexpresados en ambas comparaciones correspondieron a genes que codificaban para proteínas hipotéticas; a pesar de ser desconocidas, resalta la diversidad y abundancia de genes expresado diferencialmente, no obstante, es necesario reunir esfuerzos que mejoren la anotación del genoma de *T. cruzi*.

Dada la profundidad de secuenciación, se identificaron transcritos asignados a familias multigénicas de proteínas, que son características del parásito. En relación con la comparación de

ambas cepas a las 24 horas, en JJ21 se evidenció que se subexpresaban principalmente las familias DGF-1, GP63 y Ts, y se sobreexpresaban las TsII, TsV, MASP y TcMUCII. En la comparación de la cepa JJ21 en dos puntos de la infección, se observó que, a las 72 horas se subexpresaban DGF-1, GP63 y TcMUCII, mientras que, se sobreexpresaban las TcMUC; así mismo, en este último se observó que se sobreexpresaban procesos catabólicos. Igualmente, se reconstruyó la vía de los ribosomas para la cepa JJ21, la cual se expresó diferencialmente a las 24 horas y se sobreexpresaba a las 72 horas; y la vía de la glicolisis que se subreguló a las 72 horas de JJ21. La expresión diferencial de transcritos de familias multigénicas e involucrados en la vía de ribosomas ha sido descrita en estudios transcriptómicos previos (Belew et al., 2017; Berná et al., 2017; Cruz-Saavedra, Muñoz, et al., 2020; Ramírez, 2023)

GP63 es una familia de glicoproteínas presentes en la superficie del parásito, con actividad de proteasa ácida y asociada principalmente con funciones de virulencia (Berná et al., 2017; Mandacaru et al., 2019). Estos genes codifican para proteínas involucradas en la interacción hospedero-patógeno; además, poseen un alto número de copias y se encuentran mayoritariamente en AM (Kulkarni et al., 2009; Mandacaru et al., 2019). En este estudio, se observó que GP63 se subregula en la cepa JJ21 en las 24 y 72 horas, lo que sugiere que, en esta cepa en particular, la familia GP63 podría no ser relevante para la interacción hospedero-patógeno y virulencia. De la misma manera, se ha sugerido que la expresión de GP63 está asociada a la respuesta a estrés, ya que promueve la resistencia a péptidos antimicrobianos, la supervivencia de AM intracelulares en macrófagos y la degradación de proteínas citosólicas en las células del huésped (Cruz-Saavedra, Muñoz, et al., 2020; Mandacaru et al., 2019). Por tanto, la exposición de la cepa JJ21 a estrés puede llevar a la expresión de estos transcritos.

Las TcMUCII son el grupo de proteínas más expresado en AM, mientras que TcMUCI tiene una expresión moderada (Berná et al., 2018; Buscaglia et al., 2006). Este grupo de proteínas también cumple con roles de penetración al hospedero y evasión de la respuesta inmune (Kulkarni et al., 2009; Osorio et al., 2012). La expresión diferencial de estas proteínas ha sido asociada a diferencias fenotípicas en la virulencia entre DTUs (Berná et al., 2018). En el presente estudio, se observó que TcMUCI y TcMUCII se regulaban a la baja a las 72 horas de la cepa JJ21, sugiriendo que las diferencias de expresión están asociadas al fenotipo de cada cepa.

Las proteínas Ts son una familia heterogénea con 1400 miembros que pertenecen a 8 grupos distintos (Freitas et al., 2011). Estas proteínas transfieren ácido siálico a las mucinas, esta reacción promueve la invasión celular y protege al parásito de la respuesta inmune del hospedero; además, estas proteínas son necesarias para que *T. cruzi* escape de la vacuola parasitófora (Berná et al., 2018; dC-Rubin & Schenkman, 2012; Loch et al., 2021). De la misma manera, las Ts se expresan diferencialmente en todos los estadios de vida del parásito, y en los AM se encuentran 33 genes exclusivos que codifican para estas proteínas (Berná et al., 2017). Se observó que TsII se sobrerregulaba en la cepa del supuesto brote oral a las 24 horas. Lo anterior, podría indicar la actividad de la proteína gp82 perteneciente a las TsII, la cual ha sido relacionada con la invasión de *T. cruzi* al epitelio gástrico del mamífero (Bayer-Santos et al., 2013; Rodrigues et al., 2019). Se sugiere realizar estudios transcriptómicos con mayor profundidad, puesto que, esto puede llevar a la identificación de gp82 y otros transcritos implicados en la infección del parásito mediante el epitelio.

El catabolismo de aminoácidos es uno de los procesos que permite la proliferación en las etapas de multiplicación celular de *T. cruzi*, como los AM (Berná et al., 2017). Así mismo, procesos como la proteólisis y la glicolisis son llevados a cabo de manera regular por parte del parásito, con la finalidad de obtener energía (Berná et al., 2017; Muñoz et al., 2015). Los resultados muestran que, a las 72 horas, en los AM de la cepa JJ21 se sobreexpresaron transcritos asociados a procesos catabólicos asociados a macromoléculas y proteínas. La expresión diferencial de estos procesos supone una obtención de energía por parte del parásito, la cual es necesaria para los ciclos de multiplicación. No obstante, la vía de la glicolisis se subexpresó en la cepa JJ21 a las 72 horas. De lo anterior, se puede sugerir que, en la cepa del supuesto brote oral, se prioriza la obtención de energía por catabolismo de macromoléculas y proteínas, más no mediante la lisis de la glucosa. Aun no existen estudios que respalden esta afirmación, por tanto, se sugiere un estudio comparativo enfocado a la obtención de energía de diversas cepas.

Los tripanosomátidos cuentan con la presencia de grandes segmentos de expansión, extensiones de proteínas ribosómicas, e inserciones de ARNr adicionales, incluido un ARNr de dominio grande (Rodríguez-Almonacid et al., 2023). Además, diferentes estudios han demostrado la expresión diferencial de proteínas ribosomales entre los estadios de *T. cruzi* y *T. brucei* (Jensen et al., 2014; Smircich et al., 2015). Gracias al perfilamiento de los ribosomas se ha sugerido la existencia de

organelos especializados que modulan la traducción en respuesta a estímulos, patologías o el entorno (Chikne et al., 2016; Smircich et al., 2015). De igual forma, se sabe que estos están presentes en los distintos estadios de vida de *T. cruzi* (Cruz-Saavedra, Vallejo, et al., 2020). Los resultados de este estudio sugieren la expresión diferencial de transcritos de proteínas ribosómicas entre una cepa aislada de un caso crónico y otra cepa presuntamente aislada de un caso de Chagas oral. Se sugiere realizar un análisis proteómico donde se evalúen las proteínas ribosomales de estas cepas que participan en los procesos de regulación post traduccional. Adicionalmente, teniendo en cuenta la expresión diferencial de transcritos relacionados a ribosomas en *T. cruzi*, en sus estadios y en diferentes cepas, se hace urgente realizar diversos estudios ómicos que eluciden el papel de estos organelos y sus polimorfismos.

Hasta donde se conoce, este es el primer estudio transcriptómico que compara una cepa asociada con un presunto brote oral y una cepa de caso crónico. En este fue posible evidenciar cambios en la remodelación transcriptómica entre las cepas JJ21 y MG. Se observó cambios en la expresión diferencial de las familias de proteínas Ts, TcMUC, MASP, DGF-1 y GP63, indicando que existe un perfil transcripcional específico en la cepa de supuesto brote oral, que puede estar asociados con diferentes mecanismos de interacción hospedero-patógeno. La modulación diferencial de transcritos puede conducir a cambios en sus funciones, lo que sugiere fenotipos distintos entre las cepas. Igualmente, la vía asociada a los ribosomas presentó diferencias de expresión.

Una de las limitaciones de este estudio está asociada a las lecturas obtenidas por la profundidad de secuenciación, a pesar de ser 9Gb, no se logra obtener gran cantidad de transcritos del parásito porque este es intracelular y la cantidad de parásitos por célula es baja, además es pobre de ARN. Para observar la expresión diferencial de los transcritos, se sugiere que estudios posteriores aborden un enfoque transcriptómico de mayor profundidad, con el fin de obtener mayor número de lecturas que permitan hacer una asignación precisa a miembros de estas grandes familias de proteínas. Así mismo, se sugiere realizar estudios de transcriptómica de comparación entre distintas cepas asociadas a brotes orales y con cepas de casos crónicos. De esta manera, se llegaría a evidenciar el perfil transcriptómico de la cepas de brotes orales y la expresión de proteínas asociadas a la infección del epitelio gástrico.

Los resultados obtenidos demuestran perfiles de expresión génica diferenciales entre una cepa de *T. cruzi* asociada a Chagas oral y un caso crónico; esto permite dilucidar el panorama de la

fisiopatología de la enfermedad de Chagas, puesto que mediante la observación de los transcritos diferencialmente expresados se exhibe una interacción hospedero-patógeno diferente. Así mismo, exhiben una remodelación transcripcional principalmente relacionada con las familias multigénicas y proteínas relacionadas a la vía de los ribosomas en la cepas asociada al brote oral. Lo anterior, evidencia el rol fundamental que tienen estas proteínas durante la interacción de *T. cruzi* con el hospedero. Es importante que, diversos estudios corroboren los resultados mediante metodologías como transcriptómica y proteómica de diferentes cepas de *T. cruzi* en distintos puntos de la infección, para así evidenciar las singularidades de estas cepas, en cuanto a expresión y función de proteínas. Además, con la finalidad de observar la interacción hospedero-patógeno, se recomienda realizar ensayos de invasión *in vivo* en los que sea posible evaluar la cantidad de parásitos en las células, y los cambios del transcriptoma y proteoma del parásito y hospedero. Hasta donde la literatura lo permite, este es el primer estudio que realiza un acercamiento importante para entender la fisiopatología de la enfermedad de Chagas, y cepas asociadas a los brotes orales.

5. Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Investigaciones en Microbiología y Biotecnología de la Universidad del Rosario (CIMBIUR) por ofrecer el acompañamiento y las instalaciones para el desarrollo de este estudio. Además, al Dr. Juan Carlos Cruz Jiménez del Departamento de Ingeniería Biomédica de la Universidad de Los Andes por proporcionar los fibroblastos.

6. Material Suplementario

Figura S1. Fibroblastos infectados a lo largo del tiempo evaluado.

Figura S2. Metabolismo de las purinas, vía regulada a la baja en la cepa JJ21 a las 72 horas. Los DEG de esta vía están resaltados en verde.

Figura S3. Glicolisis, vía regulada a la baja en la cepa JJ21 a las 72 horas. Los DEG de esta vía están resaltados en verde.

TablaS1. Comparaciones realizadas en el estudio junto con el control para cada una.

Tabla S2. Secuenciación de datos para cada réplica, incluidas lecturas sin procesar, datos sin procesar, efectivos y errores.

Tabla S3. Información de DEG que incluye ID, ubicación genómica, descripción del producto y tipo de gen.

TablaS4. Datos de DEseq, incluidos el valor p y el cambio de pliegue.

TablaS5. Los datos de Gene Ontology obtenidos de TriTryp incluyen el número de genes, el enriquecimiento de veces y FDR.

TablaS6. Los datos de enriquecimiento de rutas obtenidos de TriTryp incluyen el número de genes, el enriquecimiento de veces y el FDR.

7. Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

8. Referencias Bibliográficas

- Alarcón de Noya, B., Colmenares, C., Díaz-Bello, Z., Ruiz-Guevara, R., Medina, K., Muñoz-Calderón, A., Mauriello, L., Cabrera, E., Montiel, L., Losada, S., Martínez, J., Espinosa, R., & Abate, T. (2016). Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiology and Control*, *1*(2), 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>
- Aurrecochea, C., Barreto, A., Basenko, E. Y., Brestelli, J., Brunk, B. P., Cade, S., Crouch, K., Doherty, R., Falke, D., Fischer, S., Gajria, B., Harb, O. S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Hu, S., Iodice, J., Kissinger, J. C., Lawrence, C., Li, W., ... Zheng, J. (2017). EuPathDB: The eukaryotic pathogen genomics database resource. *Nucleic Acids Research*, *45*(Database issue), D581–D591. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1105>
- Bartholomeu, D. C., Cerqueira, G. C., Leão, A. C. A., daRocha, W. D., Pais, F. S., Macedo, C., Djikeng, A., Teixeira, S. M. R., & El-Sayed, N. M. (2009). Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, *37*(10), 3407–3417. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp172>
- Bayer-Santos, E., Cunha-e-Silva, N. L., Yoshida, N., & Franco da Silveira, J. (2013). Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma*

cruzi metacyclogenesis. *Parasites & Vectors*, 6(1), 127. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-127>

- Belew, A. T., Junqueira, C., Rodrigues-Luiz, G. F., Valente, B. M., Oliveira, A. E. R., Polidoro, R. B., Zuccherato, L. W., Bartholomeu, D. C., Schenkman, S., Gazzinelli, R. T., Burleigh, B. A., El-Sayed, N. M., & Teixeira, S. M. R. (2017). Comparative transcriptome profiling of virulent and non-virulent *Trypanosoma cruzi* underlines the role of surface proteins during infection. *PLOS Pathogens*, 13(12), e1006767. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006767>
- Berná, L., Chiribao, M. L., Greif, G., Rodriguez, M., Alvarez-Valin, F., & Robello, C. (2017). Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. *PeerJ*, 5, e3017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3017>
- Berná, L., Rodriguez, M., Chiribao, M. L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., Alvarez-Valin, F., & Robello, C. (2018). Expanding an expanded genome: Long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microbial Genomics*, 4(5), e000177. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000177>
- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasch, A. C. C., & Di Noia, J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: Host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1351>
- CDC. (2019, abril 12). *CDC - Chagas Disease—Disease*. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/disease.html>
- Chikne, V., Doniger, T., Rajan, K. S., Bartok, O., Eliaz, D., Cohen-Chalamish, S., Tschudi, C., Unger, R., Hashem, Y., Kadener, S., & Michaeli, S. (2016). A pseudouridylation switch in rRNA is implicated in ribosome function during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep25296>
- Cortez, C., Yoshida, N., Bahia, D., & Sobreira, T. J. P. (2012). Structural Basis of the Interaction of a *Trypanosoma cruzi* Surface Molecule Implicated in Oral Infection with Host Cells and Gastric Mucin. *PLOS ONE*, 7(7), e42153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042153>

- Covarrubias, C., Cortez, M., Ferreira, D., & Yoshida, N. (2007). Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. *International Journal for Parasitology*, 37(14), 1609–1616.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.05.013>
- Cruz, L., Vivas, A., Montilla, M., Hernández, C., Flórez, C., Parra, E., & Ramírez, J. D. (2015). Comparative study of the biological properties of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in a murine experimental model. *Infection, Genetics and Evolution*, 29, 110–117.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.012>
- Cruz-Saavedra, L., Caceres, T., Ballesteros, N., Posada-Forero, B., & Ramírez, J. D. (2023). Differential expression of meiosis and homologous recombination-related genes in the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*.
<https://doi.org/10.1007/s00436-023-07850-2>
- Cruz-Saavedra, L., Muñoz, M., León, C., Patarroyo, M. A., Arevalo, G., Pavia, P., Vallejo, G., Carranza, J. C., & Ramírez, J. D. (2017). Purification of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes by ion exchange chromatography in sepharose-DEAE, a novel methodology for host-pathogen interaction studies. *Journal of Microbiological Methods*, 142, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.08.021>
- Cruz-Saavedra, L., Muñoz, M., Patiño, L. H., Vallejo, G. A., Guhl, F., & Ramírez, J. D. (2020). Slight temperature changes cause rapid transcriptomic responses in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Parasites & Vectors*, 13(1), 255.
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04125-y>
- Cruz-Saavedra, L., Vallejo, G. A., Guhl, F., & Ramírez, J. D. (2020). Transcriptomic changes across the life cycle of *Trypanosoma cruzi* II. *PeerJ*, 8, e8947.
<https://doi.org/10.7717/peerj.8947>
- dC-Rubin, S. S. C., & Schenkman, S. (2012). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. *Cellular Microbiology*, 14(10), 1522–1530.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01831.x>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

- Eugenia Giorgi, M., & de Lederkremer, R. M. (2011). Trans-sialidase and mucins of *Trypanosoma cruzi*: An important interplay for the parasite. *Carbohydrates as Ligands: Synthetic and Biological Aspects*, 346(12), 1389–1393.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.006>
- Filigheddu, M. T., Górgolas, M., & Ramos, J. M. (2017). Orally-transmitted Chagas disease. *Medicina Clínica (English Edition)*, 148(3), 125–131.
<https://doi.org/10.1016/j.medcle.2017.02.007>
- Franco-Paredes, C., Villamil-Gómez, W. E., Schultz, J., Henao-Martínez, A. F., Parra-Henao, G., Rassi, A., Rodríguez-Morales, A. J., & Suarez, J. A. (2020). A deadly feast: Elucidating the burden of orally acquired acute Chagas disease in Latin America – Public health and travel medicine importance. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 36, 101565. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101565>
- Freitas, L. M., Santos, S. L. dos, Rodrigues-Luiz, G. F., Mendes, T. A. O., Rodrigues, T. S., Gazzinelli, R. T., Teixeira, S. M. R., Fujiwara, R. T., & Bartholomeu, D. C. (2011). Genomic Analyses, Gene Expression and Antigenic Profile of the Trans-Sialidase Superfamily of *Trypanosoma cruzi* Reveal an Undetected Level of Complexity. *PLOS ONE*, 6(10), e25914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025914>
- Grisard, E. C., Stoco, P. H., Wagner, G., Sincero, T. C. M., Rotava, G., Rodrigues, J. B., Snoeijer, C. Q., Koerich, L. B., Sperandio, M. M., Bayer-Santos, E., Fragoso, S. P., Goldenberg, S., Triana, O., Vallejo, G. A., Tyler, K. M., Dávila, A. M. R., & Steindel, M. (2010). Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 174(1), 18–25.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.06.008>
- Gual-Gonzalez, L., Arango-Ferreira, C., Lopera-Restrepo, L. C., Cantillo-Barraza, O., Marín, D. V., Bustamante, N. R., Triana-Chavez, O., & Nolan, M. S. (2022). Acute Pediatric Chagas Disease in Antioquia, Colombia: A Geographic Location of Suspected Oral Transmission. *Microorganisms*, 10(1), Article 1.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10010008>
- Houston-Ludlam, G. A., Belew, A. T., & El-Sayed, N. M. (2016). Comparative Transcriptome Profiling of Human Foreskin Fibroblasts Infected with the Sylvio and Y

Strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLOS ONE*, *11*(8), e0159197.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159197>

- Instituto Nacional de Salud INS. (2022). *LINEAMIENTOS PARA LA CONMEMORACION DEL DIA MUNDIAL DE ENFERMEDAD DE CHAGAS 2022*.
- Instituto Nacional de Salud INS. (2019). *PortalSivigila. Subsistema de Información de Vigilancia en Salud Pública (Version 2019)*. <https://portalsivigila.ins.gov.co/>
- Jensen, B. C., Ramasamy, G., Vasconcelos, E. J. R., Ingolia, N. T., Myler, P. J., & Parsons, M. (2014). Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics*, *15*(1), 911. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-911>
- Kawashita, S. Y., da Silva, C. V., Mortara, R. A., Burleigh, B. A., & Briones, M. R. S. (2009). Homology, paralogy and function of DGF-1, a highly dispersed *Trypanosoma cruzi* specific gene family and its implications for information entropy of its encoded proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *165*(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.12.010>
- Kulkarni, M. M., Olson, C. L., Engman, D. M., & McGwire, B. S. (2009). *Trypanosoma cruzi* GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. *Infection and Immunity*, *77*(5), 2193–2200. <https://doi.org/10.1128/iai.01542-08>
- Leão, A. C., Viana, L. A., Fortes de Araujo, F., de Lourdes Almeida, R., Freitas, L. M., Coqueiro-dos-Santos, A., da Silveira-Lemos, D., Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., Teixeira-Carvalho, A., & Bartholomeu, D. C. (2022). Antigenic diversity of MASP gene family of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, *24*(6), 104982. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104982>
- Lewis, M. D., Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Langston, H., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2018). Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. *Scientific Reports*, *8*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29564-7>
- Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A. T., Choi, J., Caradonna, K. L., Padmanabhan, P., Ndegwa, D. M., Temanni, M. R., Bravo, H. C., El-Sayed, N. M., & Burleigh, B. A. (2016). Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human

Cells during Intracellular Infection. *PLOS Pathogens*, 12(4), e1005511.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005511>

- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in Public Health*, 7.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Loch, L., Onofre, T. S., Rodrigues, J. P. F., & Yoshida, N. (2021). Shedding of *Trypanosoma cruzi* Surface Molecules That Regulate Host Cell Invasion Involves Phospholipase C and Increases Upon Sterol Depletion. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.769722>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Magalhães, L. M. D., Gollob, K. J., Zingales, B., & Dutra, W. O. (2022). Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: Lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. *The Lancet Microbe*, 3(9), e711–e722.
[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00265-2)
- Mandacaru, S. C., Queiroz, R. M. L., Alborghetti, M. R., Oliveira, L. S. de, Lima, C. M. R. de, Bastos, I. M. D., Santana, J. M., Roepstorff, P., Ricart, C. A. O., & Charneau, S. (2019). Exoproteome profiling of *Trypanosoma cruzi* during amastigogenesis early stages. *PLOS ONE*, 14(11), e0225386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225386>
- Muñoz, C., San Francisco, J., Gutiérrez, B., & González, J. (2015). Role of the Ubiquitin-Proteasome Systems in the Biology and Virulence of Protozoan Parasites. *BioMed Research International*, 2015, e141526. <https://doi.org/10.1155/2015/141526>
- Nunes, M. C. P., Beaton, A., Acquatella, H., Bern, C., Bolger, A. F., Echeverría, L. E., Dutra, W. O., Gascon, J., Morillo, C. A., Oliveira-Filho, J., Ribeiro, A. L. P., Marin-Neto, J. A., & null, null. (2018). Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 138(12), e169–e209.
<https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000599>

- Oliveira, C., Holetz, F. B., Alves, L. R., & Ávila, A. R. (2023). Modulation of Virulence Factors during *Trypanosoma cruzi* Differentiation. *Pathogens*, *12*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010032>
- Organización Panamericana de la Salud OPS. (2023). *Enfermedad de Chagas—OPS/OMS*. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- Osorio, L., Ríos, I., Gutiérrez, B., & González, J. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: Who is who? *Microbes and Infection*, *14*(15), 1390–1402. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.003>
- Putri, G. H., Anders, S., Pyl, P. T., Pimanda, J. E., & Zanini, F. (2022). Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0. *Bioinformatics*, *38*(10), 2943–2945. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac166>
- Ramírez, J. L. (2023). The Elusive *Trypanosoma cruzi* Disperse Gene Protein Family (DGF-1). *Pathogens*, *12*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020292>
- Rodrigues, J. P. F., Loch, L., Onofre, T. S., & Yoshida, N. (2022). Depletion of Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1 Increases the Host Cell Resistance to *Trypanosoma cruzi* Invasion. *Pathogens*, *11*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111294>
- Rodrigues, J. P. F., Souza Onofre, T., Barbosa, B. C., Ferreira, É. R., Bonfim-Melo, A., & Yoshida, N. (2019). Host cell protein LAMP-2 is the receptor for *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 that mediates invasion. *Cellular Microbiology*, *21*(5), e13003. <https://doi.org/10.1111/cmi.13003>
- Rodríguez-Almonacid, C. C., Kellogg, M. K., Karamyshev, A. L., & Karamysheva, Z. N. (2023). Ribosome Specialization in Protozoa Parasites. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/ijms24087484>
- Sabalette, K. B., Sotelo-Silveira, J. R., Smircich, P., & De Gaudenzi, J. G. (2023). RNA-Seq reveals that overexpression of TcUBP1 switches the gene expression pattern toward that of the infective form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, *299*(5), 104623. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104623>
- Shanmugasundram, A., Starns, D., Böhme, U., Amos, B., Wilkinson, P. A., Harb, O. S., Warrenfeltz, S., Kissinger, J. C., McDowell, M. A., Roos, D. S., Crouch, K., & Jones, A. R. (2023). TriTrypDB: An integrated functional genomics resource for kinetoplastida.

PLOS Neglected Tropical Diseases, 17(1), e0011058.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011058>

- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(6), 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M. A., Guerra-Slompo, E. P., Garat, B., Goldenberg, S., Munroe, D. J., Dallagiovanna, B., Holetz, F., & Sotelo-Silveira, J. R. (2015). Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 16(1), 443. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1563-8>
- Staquicini, D. I., Martins, R. M., Macedo, S., Sasso, G. R. S., Atayde, V. D., Juliano, M. A., & Yoshida, N. (2010). Role of GP82 in the Selective Binding to Gastric Mucin during Oral Infection with *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(3), e613. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000613>
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), e1749. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- Velásquez-Ortiz, N., & Ramírez, J. D. (2020). Understanding the oral transmission of *Trypanosoma cruzi* as a veterinary and medical foodborne zoonosis. *Research in Veterinary Science*, 132, 448–461. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.024>
- WHO. (2023). *Chagas disease*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Yao, C. (2010). Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infection and Immunity*, 78(1), 22–31. <https://doi.org/10.1128/iai.00776-09>