

Identificación de transcriptos
periódicamente expresados y sus
múltiples niveles de control
mediante el análisis
transcriptómico del ciclo
proliferativo de *Trypanosoma cruzi*.

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Subárea - Biología Celular y Molecular
PEDECIBA - BIOLOGÍA

Lic. Santiago Chávez García

Laboratorio de Interacciones Moleculares - Facultad de Ciencias
Departamento de Genética - Facultad de Medicina
Universidad de la República - Uruguay

Orientadora
Dra. María Ana Duhagon
Co-orientadora
Dra. Beatriz Garat

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 – <i>Trypanosoma cruzi</i> y la enfermedad de Chagas.....	3
1.2 – Biología molecular y aproximaciones genómicas en tripanosomátidos.....	7
1.3 – El ciclo celular.....	12
OBJETIVOS.....	17
2.1 – Objetivo general.....	17
2.2 – Objetivos específicos.....	17
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....	18
3.1 – FASE I.....	18
3.2 – FASE II.....	18
3.1 – FASE III.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	58
Tabla suplementaria 1.....	58
Figura suplementaria 1.....	59
Figura suplementaria 2.....	60
Figura suplementaria 3.....	61
CONCLUSIONES.....	62
5.1 – Sincronización de cultivos y preparación del ARN.....	62
5.2 – Secuenciación masiva de los ARNs del ciclo celular.....	63
5.3 – Identificación de los genes regulados en el ciclo celular de epimastigotas.....	63
5.4 – Análisis comparativo del ciclo celular en otras especies.....	64
5.5 – Determinación de la complejidad de la regulación de los niveles de ARNm periódicos mediante meta-análisis.....	64
5.6 – Análisis composicional y estructural en los genes del ciclo celular.....	65
5.7 – Análisis de potenciales motivos de RNA en los genes del ciclo celular.....	67
PERSPECTIVAS.....	68
6.1 – Validación de cambios en amastigotas.....	68
6.2 – Regulación a nivel de traducibilidad de los ARNm del ciclo celular.....	69
6.3 – Anotación de UTRs y estudio de variantes de procesamiento.....	70
6.4 – Estudio de señales en <i>cis</i> y de posibles moléculas moduladoras.....	71
6.5 – Identificación de blancos moleculares para terapia farmacológica.....	72
6.6 – Estudiar la función de proteínas específicas-reguladoras del ciclo celular.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	73

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxi-ribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
HU	Hidroxiurea
nt	nucleotidos
PBS	Solución de Buffer Fosfatos
UTR	Regiones transcritas no traducidas (del inglés <i>Untranslated regions</i>)

INTRODUCCIÓN

1.1 – *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas.

La familia *Trypanosomatidae* agrupa a protistas mono-flagelados exclusivamente parásitos que generalmente infectan insectos. Sin embargo, en algunos géneros particulares dentro de esta familia se encuentran organismos con ciclos de vida más complejos que involucran un segundo hospedero, mayoritariamente mamíferos. En estos casos se describen varias especies de tripanosomátidos que son causantes de enfermedades infecciosas con efectos devastadores en países sub-desarrollados en regiones tropicales y sub-tropicales. En particular la tripanosomiasis americana (causada por *Trypanosoma cruzi*), la tripanosomiasis africana (causada por *Trypanosoma brucei*), y varias formas de leishmaniasis (causadas por diferentes especies del género *Leishmania sp.*), constituyen las parasitosis de mayor impacto causadas por tripanosomátidos (Stuart et al. 2008).

La tripanosomiasis americana es conocida como enfermedad de Chagas en reconocimiento al investigador Carlos Chagas que describe la sintomatología de la patología en 1909, al mismo tiempo que identifica a *T. cruzi* como el agente etiológico y al insecto triatomineo como vector responsable de la transmisión (Chagas 1909). Esta parasitosis se encuentra difundida principalmente en regiones rurales tropicales y sub-tropicales de América Latina. En estas regiones es donde originalmente se establece como una compleja antropozoonosis entre 200 a 300 años atrás, cuando la deforestación y el establecimiento de poblaciones humanas en zonas tropicales forzaron a los vectores triatomineos a colonizar las viviendas rurales y tomar a los humanos y animales domésticos como fuentes de alimentación (Coura 2007). De modo que esta patología afecta mayormente a poblaciones de bajos recursos económicos que habitan en estas regiones, lo que probablemente contribuya al bajo interés de la industria farmacológica en invertir para el tratamiento de esta afección. De esta forma, la enfermedad de Chagas es reconocida por la OMS como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas (NTD, de *neglected tropical diseases*), en conjunto con otras patologías causadas por tripanosomátidos (Molyneux 2014; WHO 2015). En Estados Unidos esta patología está considerada como una enfermedad parasítica desatendida (NPI, de *neglected parasitic infections*), las cuales han sido blanco de acción en salud pública por el Center of Disease Control (Montgomery et al. 2014). En su último reporte, la OMS estima que existen entre 7 y 8 millones de individuos afectados por la enfermedad de Chagas a nivel mundial (Savioli et al. 2013). A pesar de que la mayoría de los casos se encuentran en América latina, en años recientes se han reportado un relevante número de casos fuera de la zona endémica (Figura 1.1), donde Estados Unidos y Europa son ejemplos notorios, contando con más de 300.000 y 80.000 casos estimados respectivamente (Coura et al. 2010b).

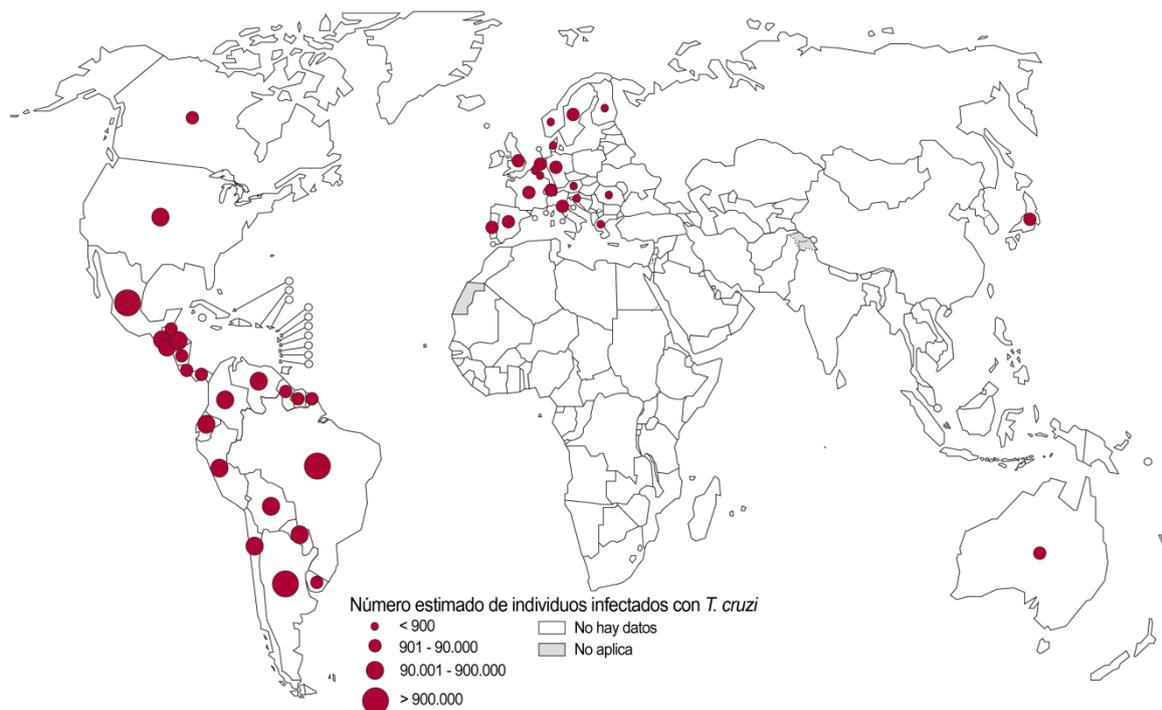


Figura 1.1 Distribución global de la enfermedad de Chagas. Número de casos tomado de estimaciones de la OMS entre 2006-2010. Imagen tomada y modificada de Savioli and Daumerie “Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases” World Health Organization (2013).

Generalmente la patología comienza con una infección aguda que está caracterizada por altas parasitemias y síntomas de intensidad variable que pueden incluir fatiga, fiebre, vómitos y diarrea. La etapa aguda puede ser fatal en niños, mientras que en individuos adultos suele presentarse de forma asintomática. Luego del período de infección aguda que dura entre 4 a 12 semanas, la enfermedad prosigue hacia una etapa indeterminada, en la cual el parásito alcanza los tejidos blanco donde se desarrollan quistes. La enfermedad luego avanza muy lentamente hacia una etapa crónica, donde en un 20-40% de los casos se observa el desarrollo de graves cardiopatías y mega formaciones digestivas que amenazan la vida del individuo afectado (Coura et al. 2010a).

Actualmente, las únicas drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas aprobadas para uso en humanos son el Benznidazol (Roche®) y el Nifurtimox (Bayer®), las cuales fueron diseñados en la década de los 70 y presentan una alta toxicidad y diversos efectos secundarios. Para ambos fármacos se ha observado una baja eficacia para tratar la etapa crónica, que es desafortunadamente la presentación más frecuente de la patología. Sin embargo, ambos fármacos tienen la capacidad de curar si son administrados en las fases tempranas de la infección. A modo de ejemplo, el Benznidazol ha demostrado una efectividad del 72 % en casos tratados dentro 4 meses luego de la infección inicial, sin embargo muestra una efectividad del 6% para tratamiento de la forma crónica (Guedes et al. 2011).

También ha sido reportada una susceptibilidad variable para el tratamiento de infecciones con diferentes cepas de *T. cruzi* (Toledo et al. 2004). En este contexto, la búsqueda de alternativas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad sigue siendo una tema prioritario en la comunidad de investigadores dedicados al trabajo en la enfermedad de Chagas (Bermudez et al. 2016).

T. cruzi exhibe un ciclo de vida complejo que se desarrolla en un hospedero mamífero y en un insecto hematófago de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* o *Panstrongylus*, que actúa como vector responsable de la transmisión a nuevos individuos (Figura 1.2). A lo largo de este ciclo, el parásito transita por cuatro estadios metabólica y morfológicamente muy diferentes (Tyler et al. 2001). En el vector se desarrollan los Epimastigotas, un estadio replicativo no-infectivo que prolifera en el intestino del insecto y diferencia en las porciones finales del tracto digestivo al estado de Tripomastigotas metacíclicos, que son las formas quiescentes e infectivas responsables de la transmisión de la enfermedad. Por otro lado, en el hospedero mamífero se pueden observar los amastigotas, que replican en el citosol de las células infectadas, y los tripomastigotas sanguíneos, que son quiescentes y al ser liberados al espacio extracelular son capaces de infectar nuevas células (ver figura 1.2 para más detalles del ciclo de vida).

Los tripanosomátidos forman parte de la familia *Trypanosomatidae*, la cual comprende un grupo de protozoarios eucariotas muy antiguos que comparten una serie de características particulares (De Souza 2002). En primer lugar, comparten la presencia de una única mitocondria de gran tamaño que se extiende a lo largo de todo el citoplasma. El ADN mitocondrial representa aproximadamente un 25% del ADN celular y este se puede observar como un disco ligeramente cóncavo electrón-denso en microscopía electrónica, a esta estructura típica de los tripanosomátidos se la conoce como kinetoplasto. El complejo genoma mitocondrial consiste en un entramado de fibras de ADN circular concatenadas (Simpson 1973), en las que se puede describir dos tipos de ADN circulares, maxicírculos y minicírculos. Los maxicírculos, que generalmente tienen 25 kb de extensión, codifican para genes mitocondriales como ARN ribosomales y proteínas de la cadena respiratoria. Los minicírculos, de aproximadamente 1 kb de largo, codifican para pequeños ARN no codificantes (ARN guías) que participan en el procesamiento de los transcritos mitocondriales (Aphasizhev et al. 2011). Este forma particular de procesamiento post-transcripcional fue descrito por primera vez en tripanosomátidos y se conoce como *editing* (Benne et al. 1986). En breve, los transcritos mitocondriales son editados por adición/eliminación de residuos de uridina en sitios específicos, los cuales son determinados por los ARN guías que interaccionan por hibridación con la región a modificar. Este proceso asegura la correcta expresión de los productos mitocondriales, tal como la recuperación del marco de lectura correcto en algunos casos.

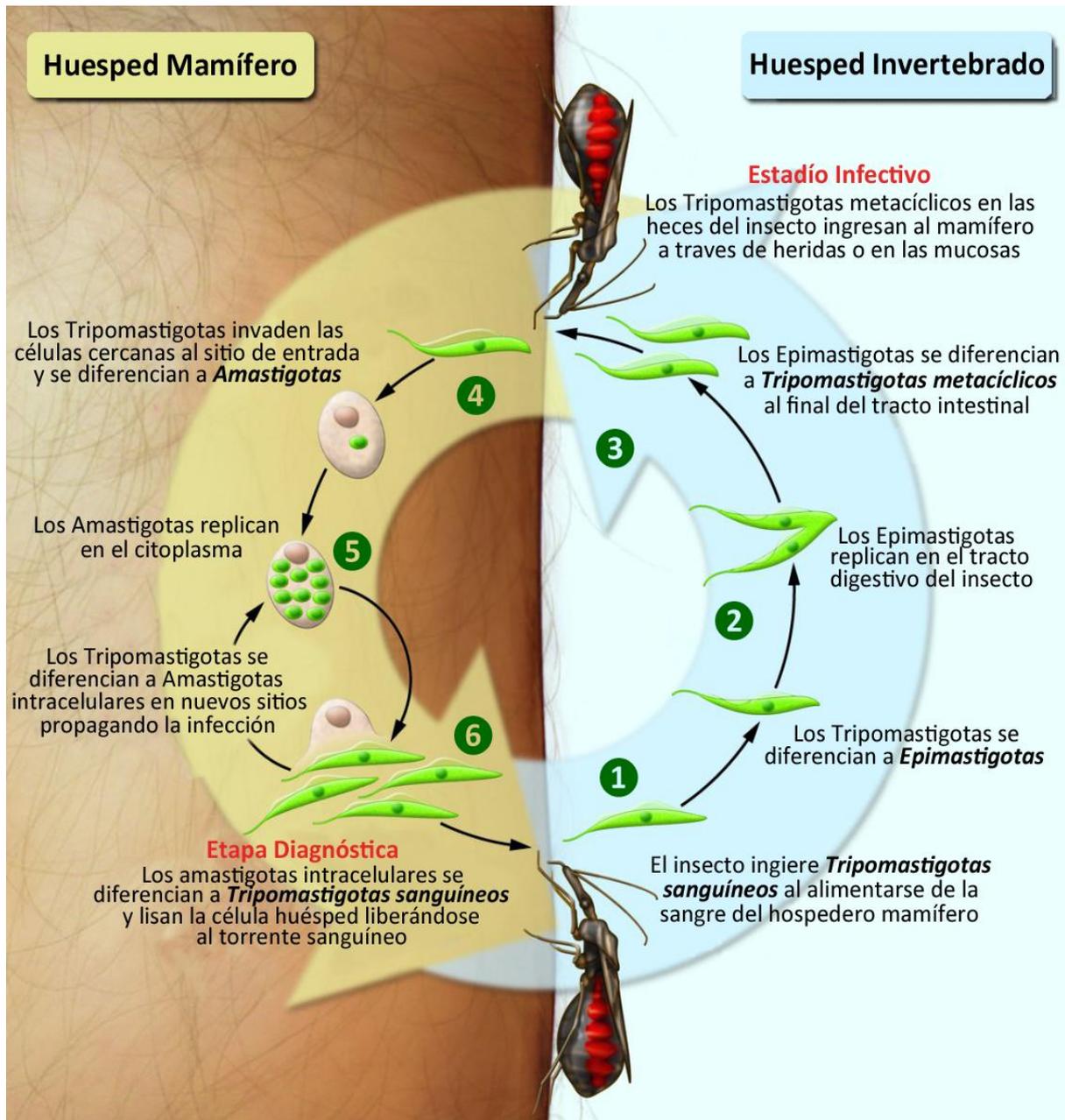


Figura 1.2 Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*. 1) Se inicia el ciclo cuando un insecto triatomineo ingiere parásitos (*Tripomastigotas sanguíneos*) al alimentarse de la sangre de un individuo infectado. 2) Al avanzar por el tracto digestivo del insecto, los *tripomastigotas* se diferencian a la forma Epimastigota, que proliferan en el tracto medio del intestino. 3) Cuando los Epimastigotas alcanzan la ampolla rectal son estimulados a diferenciarse a *Tripomastigotas metacíclicos*, que son depositados con las heces del insecto y son capaces de ingresar al nuevo individuo a través de heridas o por las superficies mucosas. 4) Los *tripomastigotas* ingresan al citoplasma de células generalmente ubicadas en la cercanía del sitio de entrada y se diferencian a Amastigotas. 5) Los Amastigotas son capaces de proliferar en el ambiente intracelular. 6) Los amastigotas se diferencian a *Tripomastigotas sanguíneos* y luego de la lisis de la célula hospedera son liberados al torrente sanguíneo. En el sistema circulatorio los *tripomastigotas* son capaces de colonizar nuevos tejidos, propagando la infección en el organismo del individuo afectado. El ciclo se completa cuando un insecto ingiere estos *tripomastigotas* al alimentarse de la sangre del hospedero mamífero. Imagen tomada y modificada de Stuart et al. "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases" J. Clin. Invest. 118:1301–1310 (2008).

Otras particularidades de este grupo de organismos se dan durante la mitosis, donde no se observa la condensación del ADN nuclear al nivel de cromosomas metafásicos y la segregación de la cromatina se da dentro del núcleo, debido a que no se da la disgregación de la envoltura nuclear (Solari 1995). Debido a esto, el número total de cromosomas del complemento haploide de *T. cruzi* se ha mantenido en una continua discusión, sin embargo, actualmente el número más aceptado es 41 cromosomas (Porcile et al. 2003; Branche et al. 2006).

1.2 – Biología molecular y aproximaciones genómicas en tripanosomátidos.

T. cruzi es capaz de adaptarse y proliferar en una serie de ambientes muy variados, enfrentando desafíos como cambios en la temperatura, variable disponibilidad de nutrientes, presencia de sistemas de defensa en el hospedero vertebrado, e incluso alternancia entre el medio extracelular y el intracelular. Por lo tanto, la modulación rápida de la expresión génica juega un rol preponderante en la capacidad de estos organismos a adaptarse y sobrevivir frente a situaciones adversas. Al mismo tiempo que este parásito presenta un grupo de características particulares a nivel de la biología celular, los mecanismos de expresión génica y su regulación también presentan peculiaridades llamativas, algunas de las cuales se esquematizan en la Figura 1.3 (Clayton 2002; Martínez-Calvillo et al. 2010).

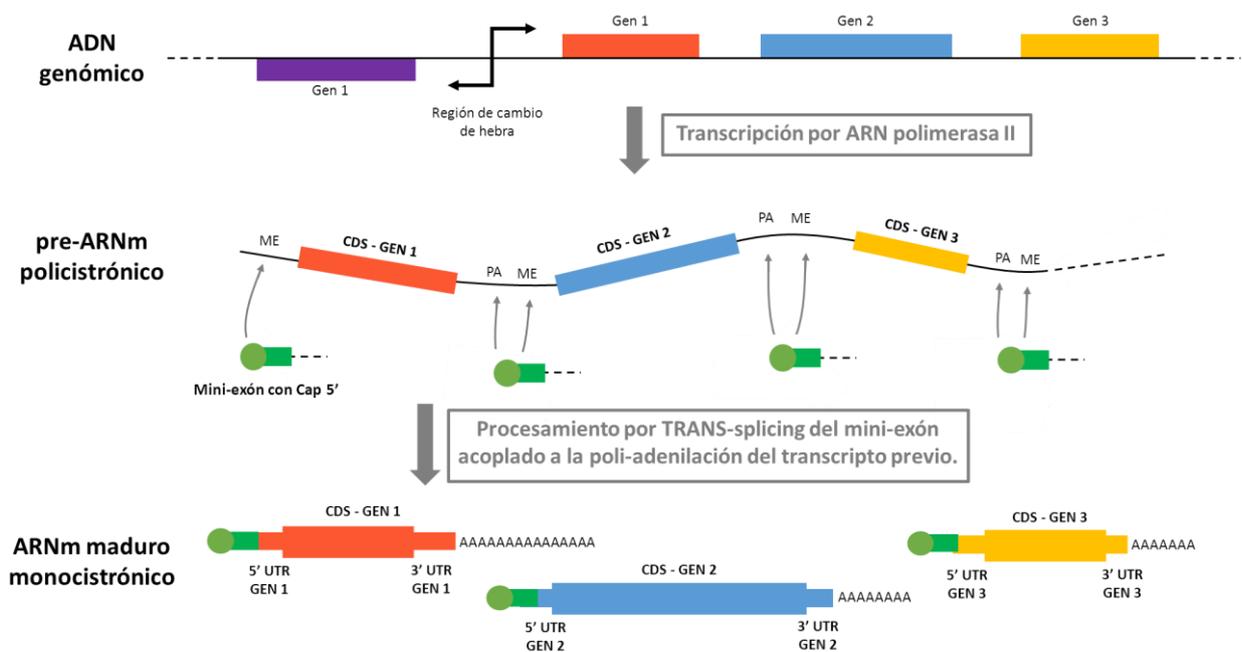


Figura 1.3 Expresión génica en tripanosomátidos. Se esquematizan las etapas de transcripción y procesamiento de los transcritos primarios. El ARN del mini-exón también es transcrito por la ARN polimerasa II a partir de otra región genómica.

En primer lugar, los genomas de los tripanosomátidos se organizan en largos tractos de genes co-orientados codificados sobre la misma hebra, los cuales se transcriben por la ARN polimerasa II dando lugar a grandes transcriptos primarios policistrónicos. A pesar de que esta organización genómica recuerda a la estructura de los operones de procariontes, en este caso no se observan agrupaciones funcionales en los genes de un mismo policistrón. Por otro lado, estas unidades transcripcionales son de mayor tamaño que los operones, ya que pueden contener decenas en incluso alcanzar un pocos cientos de genes (Palenchar et al. 2006). Los extensos transcriptos policistrónicos deben luego ser procesados para dar lugar a los transcriptos monocistrónicos típicos de eucariotas. Dicho procesamiento involucra la participación de un transcripto corto conocido como mini-exón (ME) o *splice-leader*. Este ARN se produce a una alta tasa desde regiones genómicas donde los genes se disponen en tándem presentando cada copia un promotor individual para ARN polimerasa II (Gilinger et al. 2001). Para la maduración de los transcriptos codificantes para proteínas se requiere la adición del mini-exón al extremo 5' de cada futuro ARNm (Figura 1.3). Esto se da por el mecanismo de corte y empalme, una clase de *splicing* que se designa como *TRANS-splicing* por involucrar dos moléculas diferentes, el cual fuera descrito por primera vez en tripanosomátidos (Sather 1985; Agabian 1990). La caperuza 5' es aportada por el mini-exón, que fue modificado por la adición de un par de nucleósidos modificados previamente a ser agregado al ARN mensajero maduro, dando lugar a la estructura conocida como "cap-4", también particular de estos organismos (Perry et al. 1987; Bangs et al. 1992). El mini-exón se transcribe como un precursor de 140 bases; sin embargo el fragmento que queda incorporado al 5' de los ARNm es de 38-40 bases (De Lange et al. 1984). Un di-nucleótido AG en el sitio 3' de *splicing*, acompañado de una región corriente arriba rica en pirimidinas son las secuencias conservadas que son requeridas para dirigir la maquinaria de *TRANS-splicing* (Hummel et al. 2000). Este proceso parece estar acoplado al procesamiento por poliadenilación, dado que se ha observado que la selección del sitio de *splicing* del mini-exón influencia la selección del sitio de poliadenilación del extremo 3' del transcripto previo en el policistrón (LeBowitz et al. 1993). De esta forma se generan los ARNm maduros monocistrónicos que serán transportados al citosol para su traducción.

La transcripción se inicia en regiones intergénicas donde un policistrón avanza hacia uno de los extremos del cromosoma con sus genes codificados en una de las hebras y el policistrón adyacente se orienta hacia el otro extremo, con sus genes codificados en la hebra opuesta (Martinez-Calvillo et al. 2003). En esta ubicación, conocida como región de cambio de hebra divergente, se da la iniciación de la transcripción aunque no se han identificado promotores canónicos para la ARN polimerasa II ni otros tipos de señales a nivel de elementos de secuencia. Sin embargo, en estos sitios se ha descrito la presencia de marcadores de iniciación transcripcional y cromatina activa, tal como histonas modificadas, variantes histónicas y factores de transcripción (Respuela et al. 2008; Siegel et al. 2009;

Thomas et al. 2009). Además, se ha observado que el ADN adopta una curvatura particular en los cambios de hebra divergente, lo que podría contribuir a la identificación de estas regiones por parte de la maquinaria transcripcional (Smircich et al. 2013).

En virtud de las evidencias actuales, todos los genes que conforman un policistrón dado serán posiblemente transcritos a niveles idénticos como consecuencia directa de la transcripción policistrónica. Es decir, los tripanosomátidos no regulan la tasa a la que transcriben genes dentro de una misma unidad transcripcional, al punto de que, se propone todos los genes codificantes para proteínas del genoma se transcriben a niveles similares. Sin embargo, las diferencias notorias en los niveles de ARNm maduro en estado estacionario para genes adyacentes en el mismo policistrón, muestran claramente que los tripanosomátidos utilizan ampliamente los mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional para producir la expresión diferencial de sus genes (Krieger et al. 1999; Ávila et al. 2003). El procesamiento del transcripto primario de ARN, la exportación del ARN maduro al citosol, la estabilidad o degradación diferencial de los ARNs, la movilización a la fracción polisomal y la accesibilidad a la maquinaria de traducción de los transcriptos son todos eventos donde se puede regular la expresión génica de manera post-transcripcional. En *T. cruzi* se han reportado múltiples ejemplos de regulación post-transcripcional que resultan fundamentales en ciertos fenotipos o procesos celulares (Benabdellah et al. 2007; Perez-Diaz et al. 2013; Inoue et al. 2014; Alves et al. 2015). En particular, las regiones transcritas no traducidas (UTRs, de *Untranslated Regions*) presentan elementos que permiten la regulación de los transcriptos que los portan mediante la unión a proteínas específicas conocidas como RBPs (de *RNA Binding Proteins*), que particularmente en tripanosomátidos son una familia génica muy extensa (De Gaudenzi et al. 2003). De esta forma, una de las teorías más aceptadas últimamente propone la figura de los operones post-transcripcionales como complejos ribonucleoproteicos donde grupos de ARNm serían regulados en conjunto por las RBPs que los reconocen (Ouellette et al. 2009; De Gaudenzi et al. 2013).

El primer genoma completo para *T. cruzi* se publicó en el 2005 (El-Sayed et al. 2005a), junto con la secuenciación de los genomas de los restantes tripanosomátidos de relevancia sanitaria en humanos, *T. brucei* (Berriman et al. 2005) y *L. major* (Ivens et al. 2005). Estos trabajos formaron parte de una edición especial de la revista *Science* junto con la publicación de un estudio comparativo entre estos tres organismos, que dentro de la comunidad que trabaja en ellos se los conoce como *Trityps* (El-Sayed et al. 2005b). Este estudio revela que los tripanosomátidos tienen un grupo básico de 6200 genes compartidos entre ellos y luego presentan una serie de grandes familias génicas divergentes que están relacionadas a los procesos infectivos específicos de cada parásito. En particular, el genoma de *T. cruzi* se secuenció usando la cepa CL Brener (del grupo TcIV) y cursó dificultades en la etapa de ensamblado debido a la naturaleza altamente repetitiva de este genoma sumado al hecho de que la cepa resultó ser

un híbrido de 2 haplotipos parentales divergentes. Para intentar resolver esta última problemática se realizó una secuenciación a baja cobertura del genoma de la cepa Esmeraldo (grupo TcI), que correspondía a uno de los haplotipos que se combinaron al formarse la cepa híbrida. Los más de 22.000 marcos abierto de lectura obtenidos en la secuenciación de CL-Brener se clasificaron entonces en tipo-Esmeraldo o tipo-No Esmeraldo, según su homología con las secuencias del proyecto Esmeraldo. No fue sino hasta unos años después que se pudo mejorar la anotación mediante esfuerzos que resultaron en el mapeo de las secuencias genómicas a los cromosomas (Weatherly et al. 2009). Sin embargo, debido principalmente al alto número de secuencias repetidas, el genoma de *T. cruzi* todavía contiene regiones sin resolver completamente y su anotación continúa siendo la menos completa dentro de los Trityps. A pesar de esto, hoy día sabemos que en el complemento haploide el genoma de *T. cruzi* se extiende aproximadamente 55-60 Mb y contiene por encima de 10.000 genes codificantes para proteínas. Para más del 50% de estas proteínas, no se pudo adjudicar una posible función por homología a proteínas conocidas y entonces se las clasifica como proteínas hipotéticas. En años posteriores, debido principalmente al avance de las tecnologías de secuenciación masiva, se obtuvieron secuencias genómicas para un mayor número de cepas y subespecies de *T. cruzi* (Franzen et al. 2011; Hamilton et al. 2011; Franzen et al. 2012; Grisard et al. 2014), lo cual ha permitido que se lleven adelante análisis comparativos y de diversidad genética (Ackermann et al. 2012; Franzen et al. 2012).

En lo que refiere a la genómica funcional en *T. cruzi*, el trabajo pionero de Minning y colaboradores analizó el transcriptoma a lo largo del ciclo de vida utilizando microarreglos de ADN (Minning et al. 2009). Los resultados de este estudio revelaron que aproximadamente un 50% de los genes estudiados estarían sometidos a regulación del nivel de transcripto a lo largo del ciclo de vida *T. cruzi*, nuevamente remarcando la capacidad de estos organismos de regular la abundancia de sus ARNm a pesar de la ausencia de modulación en el inicio de la transcripción. Resulta altamente interesante el alcance de estos resultados considerando que cuentan con las limitaciones asociadas a las metodologías de microarreglos de ADN, tal como el bajo rango dinámico de cuantificación, la baja sensibilidad y la limitación en la cantidad de genes para los que se diseñen sondas. A pesar de que en paralelo se han realizado varios estudios de proteómica que utilizan metodologías de punta, el número de genes diferencialmente expresados identificados por los mismos es aún bajo, lo cual se justifica por la aún reducida sensibilidad y el bajo poder cuantitativo de estas aproximaciones (de Godoy et al. 2012). Recientemente, nuestro grupo ha estudiado el transcriptoma y la fracción de transcriptos traducionalmente activos (estudio del traductoma o *ribosome profiling* (Ingolia et al. 2009)) en la diferenciación desde el estadio epimastigota al metacíclico (Smircich et al. 2015). En este análisis se verificó el alcance de la transcripción constitutiva en tripanosomátidos, dado que de los 10600 transcriptos anotados se detectó ARN para 9122 y 9092 transcriptos en epimastigotas y tripomastigotas

respectivamente. Del mismo modo, se observó que un 25% de los genes presentan expresión diferencial a nivel de la abundancia de mensajeros en la metaciclologénesis. Por otro lado, se determinó una relevante disminución en los niveles de traducción de un grupo de genes en los tripomastigotas metacíclicos respecto a los epimastigotas, lo cual es indicativo de la importancia que tendría la regulación a nivel de la traducibilidad en el proceso de diferenciación a esta forma infectiva. Al estudiar la tasa entre los niveles obtenidos en traductoma y los de transcriptoma se puede estimar la eficiencia traduccional que un gen dado presenta en cada situación. Utilizando esta estrategia se observó que la familia de las proteínas ribosomales presentaban un alta eficiencia traduccional en epimastigotas mientras que en los tripomastigotas la misma disminuía a niveles muy bajos. Un efecto inverso se observó al analizar el cambio en eficiencia traduccional para la familia de las transialidasas, que se traducen eficientemente en los tripomastigotas donde actúa como un factor de virulencia muy importante en los procesos infectivos.

En el marco de los vertiginosos avances tecnológicos que han impulsado a la genómica en años recientes se hizo necesario que la generación de herramientas y plataformas para el análisis de la inmensa cantidad de datos que se generan actualmente. Particularmente en el área de la parasitología se generó una plataforma web, conocida como EupathDB (Aurrecoechea et al. 2010), que está enfocada al análisis y revisión de datos genómicos depositados en las bases de datos asociadas para el estudio de patógenos eucariotas que causan afecciones en humanos. Dentro de este proyecto se enmarca la base de datos específica de tripanosomátidos, que se dio a llamar TritrypDB (Aslett et al. 2010). En este portal web se puede acceder a las secuencias genómicas (archivos fasta) y los archivos de anotación genética (archivos gff) de una amplia variedad de cepas que han sido secuenciadas recientemente para los tritryps y otras especies relacionadas. Asimismo, se puede obtener los datos básicos de un gen particular, como ser la secuencia del transcripto, la secuencia codificante y la secuencia proteica, datos de anotación, términos ontológicos relacionados y los genes ortólogos presentes en los tripanosomátidos que forman parte de la base. Al mismo tiempo se puede consultar datos de los estudios de genómica funcional que hayan sido llevados a cabo en ese organismo, tales como datos de expresión en el ciclo de vida o de esencialidad del gen evaluados en estudios de interferencia de ARN.

En el escenario recién descrito donde los datos en *T. cruzi* a nivel de perfiles transcriptómicos y proteómicos todavía son escasos, consideramos meritoria la aplicación de un estudio por perfiles de expresión génica que se enfoque en explorar los procesos regulatorios que gobiernan un blanco terapéutico fundamental: el control de la proliferación parasitaria.

1.3 – El ciclo celular.

El ciclo celular es la secuencia coordinada de eventos que dan lugar a la duplicación celular en organismos eucariotas. Consiste en períodos de crecimiento celular, duplicación y segregación del material celular, y finalmente la división de la célula. Durante el ciclo celular prototípico se pueden definir 4 etapas principales: una etapa de duplicación del material genético (fase S), una etapa de división y segregación nuclear, fase M (mitosis), y dos etapas que circunscriben la fase S y se denominan fases *gap* o intervalo, conocidas como G1 y G2. Una alta actividad metabólica caracteriza a las fases G1 y G2, sin embargo en G1 se prioriza el crecimiento celular mientras que en G2 la celular se prepara para la consiguiente fase M de división nuclear. Por último, a pesar de estrictamente no formar parte del ciclo celular, en paralelo a las últimas etapas de la fase M se lleva a cabo la división del citoplasma (Citocinesis) que resultará en la formación de las células hijas separadas físicamente por membrana plasmática (Harashima et al. 2013).

Para la progresión del ciclo celular, es necesaria una maquinaria de control que regule las transiciones entre los eventos y que asegure que los mismos sucedan en el orden correcto y una única vez por ciclo. De esta forma, el ciclo puede detenerse en ciertos puntos de control (*checkpoints*) si se detecta que no hay una situación favorable para continuar con las etapas siguientes. Los checkpoints más conservados en eucariotas son el de G1/S, el de G2/M y el del pasaje Metafase/Anafase de la mitosis. En el checkpoint G1/S se verifica la disponibilidad de nutrientes y condiciones ambientales favorables para comprometerse a la duplicación celular. En particular, se chequea la integridad del material genético y la disponibilidad de nutrientes para iniciar la síntesis del mismo. Para iniciar la fase M se debe asegurar la completa y correcta duplicación del material genético en el checkpoint G2/M. Por último, en el checkpoint Metafase/Anafase se verifica el correcto alineamiento de los cromosomas en la placa metafásica para asegurar la correcta segregación que se produce en la Anafase.

Los tripanosomátidos cuentan con características específicas que aumentan la complejidad del ciclo, y que, en parte, pueden explicar la divergencia con los mecanismos observados en los eucariotas modelo. En primer lugar, se enfrentan con la dificultad de dividir una célula altamente polarizada con una arquitectura celular compleja y la necesidad de segregar varios organelos únicos, como la altamente especializada mitocondria, el flagelo asociado a su cuerpo basal (McKean 2003; Elias et al. 2007). Estos eventos están finamente sincronizados, a pesar de que su división y segregación no coincide temporalmente con la división del núcleo, por lo que se han propuesto puntos adicionales de control o checkpoints en el ciclo (Ploubidou et al. 1999), que no están presentes en la célula de mamíferos (Figura 1.3).

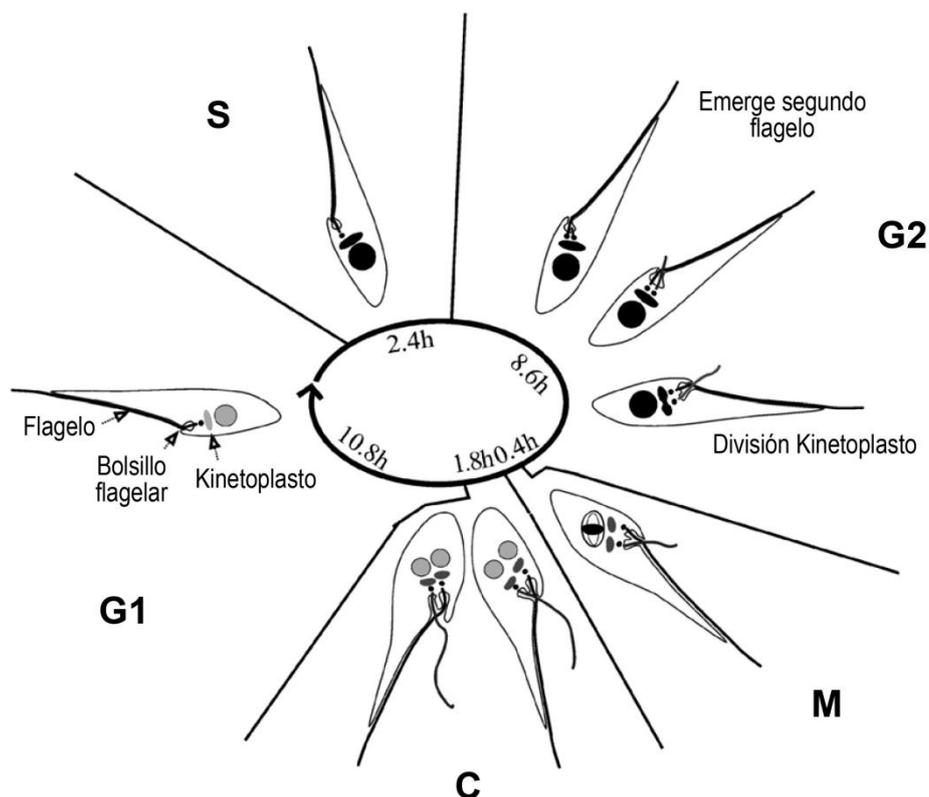


Figura 1.4 Eventos morfológicos en el ciclo celular de *T. cruzi*. Se esquematizan los principales procesos morfológicos a lo largo del ciclo celular, con el tiempo expresado en horas (h). Los organelos que contienen ADN se presentan en gris cuando no está duplicado el material y en negro luego de la duplicación del material. Imagen tomada y modificada de Elias et al. "Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle" Protist. 158(2):147-57 (2007).

Asimismo, la integración necesaria para coordinar la alternación entre estadios del ciclo vida replicativos y no-replicativos con la progresión del ciclo señala un grado alto de complejidad en los mecanismos de control. Estas evidencias han conducido a que el ciclo celular de los protozoarios patógenos, como *T. cruzi*, haya sido propuesto por varios autores como una fuente importante de blancos para el desarrollo de drogas (Hammarton et al. 2003; Naula et al. 2005; Grant 2008) dado que no hay nada más esencial para la supervivencia de un organismo unicelular que su habilidad para dividirse y proliferar. Es así que la alta tasa de replicación de los estadios que infectan al hospedero mamífero está considerada como uno de los puntos más importantes en la patogenicidad de estos organismos.

Por otro lado, hay gran cantidad de evidencia que muestra que la regulación de varios factores del ciclo celular ocurre a nivel post-traducciona, con eventos como la activación/inhibición por fosforilación/defosforilación de factores y la proteólisis guiada por ubiquitinación. Sin embargo, en el caso de las ciclinas, que constituyen uno de los factores determinantes de la progresión del ciclo celular

se ha encontrado una alta regulación a nivel transcripcional (Murray 2004; Berckmans et al. 2009), lo que las hace factibles de ser analizadas en aproximaciones de tipo transcriptoma. De hecho, en mamíferos y levaduras, se ha estudiado que la transcripción periódica se logra mediante la expresión secuencial de dos factores de transcripción que han sido extensamente caracterizados: el factor E2F1, expresado en las fases G1 y S, y el factor FOXM1 en mitosis (Bertoli et al. 2013; Grant et al. 2013). Al mismo tiempo, el ciclo celular ha sido estudiado extensivamente utilizando la estrategia de microarreglos de ADN, habiéndose determinado a los perfiles de expresión génica periódica en varios organismos, incluyendo especies del género *arabidopsis* (Menges et al. 2002), levaduras (Cho et al. 1998; Rustici et al. 2004), bacterias (Laub et al. 2000) y varios tipos de células humanas (Iyer et al. 1999; Whitfield et al. 2002; Pena-Diaz et al. 2013). La mayor parte de estos datos se encuentran recopilados en la base de datos Cyclebase, que puede ser consultada tanto para datos sobre un gen particular de interés como para conocer los grupos de genes regulados a nivel de abundancia de transcripto a lo largo del ciclo celular, denominados como “periódicos” en esta base (Santos et al. 2015). Más recientemente se ha publicado un trabajo en levaduras que por primera vez dirige el análisis hacia la dinámica de síntesis y degradación de los ARNm durante el ciclo celular (Eser et al. 2014). Los autores proponen que los genes del ciclo celular sufren degradación periódica controlada de sus ARNm como un mecanismo de modulación fina que produce una expresión temporal más precisa.

A pesar de que todavía se conoce poco sobre los mecanismos moleculares que gobiernan la regulación del ciclo celular en tripanosomátidos, la evidencia disponible sugiere que existe una divergencia significativa con los mecanismos que se conocen del estudio de organismos eucariotas modelo, y más aun con los observados en el hospedero humano (Hammarton 2007). La mayor parte del conocimiento que existe respecto a la regulación en el ciclo celular proviene de trabajos realizados en *T. brucei* (Zhou et al. 2014). A pesar de que *T. brucei* y *T. cruzi* comparten muchas características, estos organismos están evolutivamente alejados y eso da lugar a diferencias muy importantes respecto a su biología celular, su patogenicidad y también a la progresión del ciclo proliferativo.

Dentro de los estudios de caracterización de proteínas individuales relacionadas al ciclo celular en *T. cruzi*, el proceso de replicación de ADN y la maquinaria que participa en el mismo ha sido estudiado en detalle y ha mostrado que varios componentes presentan un alta divergencia con los de humanos (Godoy et al. 2009; Calderano et al. 2011; Calderano et al. 2014). Por otro lado, también se ha trabajado en la caracterización de las histonas y sus modificaciones, observándose que los niveles de ARNm y proteicos varían durante el ciclo proliferativo así como también en el ciclo de vida de *T. cruzi* (Recinos et al. 2001; Sabaj et al. 2001; da Cunha et al. 2005; Nardelli et al. 2009). Respecto a los tradicionales reguladores del ciclo celular, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), se han realizado varios estudios por parte del grupo de la Dra. Tellez-Iñon, en los cuales se evidencia la

divergencia de estas vías regulatorias en los tripanosomátidos. En primer lugar se describieron dos proteínas que se denominan CRKs (de Cdc-2 Related kinases), que serían los equivalentes a las CDKs en estos organismos (Gómez et al. 1998; Gomez et al. 2001). El primero de estos trabajos constituyó la primer evidencia de proteínas tipo CDKs funcionales (TcCRK1) en *T. cruzi*, mientras que en el segundo trabajo se logró caracterizar las actividades de TcCRK1 y TcCRK3 al mismo tiempo que se identificaron tres posibles proteínas tipo ciclinas que podrían interaccionar con dichas CRKs, mediante ensayos de doble híbrido en levaduras. En un trabajo posterior se verificó la periodicidad en la actividad catalítica de la proteína CRK3 a lo largo del ciclo, validando así su participación en la progresión del ciclo celular (Santori et al. 2002). En estudios posteriores el mismo grupo logró identificar y caracterizar a la proteína Tcpc12CKS1, un regulador clave del ciclo celular que interacciona de forma estable con TcCRK1 y TcCRK3 y rescatar un mutante nulo de p13SUC1 en un ensayo de complementación de función en levaduras (Munoz et al. 2006). De las 10 ciclinas que fueron identificadas en el genoma de *T. cruzi*, dos de ellas han sido caracterizadas recientemente por este grupo, demostrando su participación en el ciclo celular de *T. cruzi*. Para la ciclina 2 (TcCYC2), se demostró la actividad ciclina en un ensayo de complementación en levaduras, mientras que en parásitos que sobre-expresan TcCYC2 se observó una disminución del tiempo de duplicación junto con una acumulación de los parásitos en G2/M (Potenza et al. 2012). En el caso de la ciclina 6 (TcCYC6), como se sospechaba debido a análisis de homología con otras ciclinas ya caracterizadas, se demostró que es una ciclina mitótica (Di Renzo et al. 2015). De hecho, su sobreexpresión mostró ser perjudicial para la proliferación en epimastigotas y se determinó que estaría siendo regulada por degradación dependiente de la vía de ubiquitinación, lo cual es frecuente en ciclinas de este tipo.

De momento solo se cuenta con un único estudio global sobre expresión génica en tripanosomátidos, el cual fue llevado a cabo en *T. brucei* por Archer y colaboradores (Archer et al. 2011). Si bien parte del trabajo se centra en presentar la metodología de elutriación como estrategia para obtener células en distintas etapas del ciclo celular en *T. brucei*, en este trabajo los autores fueron capaces de determinar un total de 546 genes regulados, trabajando con un total de 4 fases del ciclo: G1 temprana, G1 tardía, S y G2/M. Asimismo, observan que solo una minoría de estos genes tiene homólogos relacionados al ciclo celular en los trabajos realizados en humanos y levaduras. A pesar de esto, los estudios de ontología génica de los genes de expresión diferencial correlacionan con procesos celulares esperados para las correspondientes etapas del ciclo donde los genes se expresan. Por último, los autores describen motivos de secuencia sobre-representados en las regiones UTRs de grupos de genes co-regulados, lo que apunta a la posible existencia de proteínas reguladoras que puedan ser responsables de la expresión periódica de estos genes. De hecho como parte de un trabajo previo de este mismo grupo, se había descrito que la RBP PUF9 (de la familia de proteínas pumilio) mostraba

niveles regulados a lo largo del ciclo celular y que se obtenía una acumulación de parásitos en la etapa G2/M al disminuir la expresión de este gen por RNAi (Archer et al. 2009). Estos resultados apuntan a la importancia de los mecanismos de regulación post-transcripcional en el control de la proliferación en estos organismos.

En este trabajo nos proponemos avanzar en el entendimiento de los mecanismos que controlan las transiciones proliferativas G1-S-G2/M en *T. cruzi*. Considerando que de momento no existen estudios que apunten a esta temática en este organismo, nosotros planteamos determinar los genes involucrados y las vías de regulación claves que gobiernan estos procesos, al mismo tiempo que intentamos identificar posibles módulos y mecanismos globales de regulación de la expresión génica. Para este fin, utilizamos una estrategia de secuenciación masiva de ARN junto con herramientas de genómica y bioinformática.

OBJETIVOS

2.1 – Objetivo general.

Contribuir a la caracterización de los mecanismos moleculares que gobiernan el ciclo proliferativo de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 – Objetivos específicos.

- a. Identificar genes diferencialmente expresados.
- b. Identificar patrones globales de regulación de la abundancia de los ARNm
- c. Identificar posibles mecanismos de control de la expresión génica.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

La estrategia de investigación utilizada en este proyecto constó de tres fases.

3.1 – FASE I

En la **Fase I** se propuso obtener poblaciones sincrónicas de cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* enriquecidas en las fases G1, S y G2/M del ciclo celular. Para esto se utilizó el método de arresto de la proliferación inducido por hidroxurea (Galanti et al. 1994). Se trabajó con la cepa TcI, que fue cedida por la Dra. Mariana Potenza, del Instituto INGEBI en Buenos Aires, dado que responde bien al tratamiento con hidroxurea. La puesta a punto del método junto con la selección de la cepa habían sido realizadas previamente en el marco de la tesina de grado (Chavez 2012). Una vez obtenidas las muestras se planifica.

3.2 – FASE II

En la **Fase II** se aisló ARN total a partir de las poblaciones de parásitos enriquecidas en las tres etapas del ciclo celular y se evaluó si el mismo satisfacía los requerimientos de la secuenciación masiva. Al mismo tiempo se realizaron controles por PCR en tiempo real cuantitativa para evaluar la capacidad de detectar modulación de la expresión génica en nuestras muestras. Para esto se seleccionaron genes candidatos a estar regulados en el ciclo y se diseñaron los cebadores correspondientes. A partir de los ARNs obtenidos se prepararon bibliotecas y las muestras fueron enviadas para su secuenciación para la secuenciación profunda en la plataforma HiSeq 2000 (Illumina®), servicio prestado por la empresa BGI Genomics. Se optó por ordenar 40 millones de lecturas por muestra, del tipo lecturas simples de 50 pares de bases, maximizando así la cantidad de lecturas a obtener con el fin de darle mejor poder estadístico a los análisis posteriores.

3.1 – FASE III

Como parte de la **Fase III** de este trabajo se realizaron los análisis bioinformáticos de los datos de secuenciación obtenidos. Las lecturas de buena calidad se mapearon al genoma de *T. cruzi* y se cuantificó la acumulación de lecturas sobre cada transcripto. Se obtuvieron perfiles de expresión génica para cada estadio y en base a eso se determinaron los genes cuyos niveles se vieron modulados en cada transición (G1-S, S-G2 y G1-G1). Se analizaron los patrones de regulación, obteniéndose módulos de genes co-regulados, para los cuales se realizaron análisis de ontología génica y vías de señalización. Luego se estudiaron diversas propiedades de los genes seleccionados en busca de posibles mecanismos moleculares que expliquen la regulación observada (señales en cis, ubicación de los genes, propiedades de los transcriptos). Los resultados obtenidos se comparan con los datos de estudios en el ciclo celular disponibles para *Trypanosoma brucei* (Archer et al. 2011) y modelos eucariotas como levaduras y el hospedero humano (Santos et al. 2015). Por último se realizó una comparación de nuestros resultados con los datos del único estudio transcriptómico por secuenciación masiva de la diferenciación desde epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos (Smircich et al. 2015).

La metodología utilizada en este trabajo se describe en un artículo científico redactado en inglés. En el mismo se incluye abundante material de soporte a efectos de mostrar en más profundidad detalles de la metodología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron durante este trabajo de tesis y la discusión de los mismos se desarrollan en un artículo científico escrito en idioma inglés que fué sometido a revisión en la revista internacional arbitrada PLOS Neglected Tropical Disease.

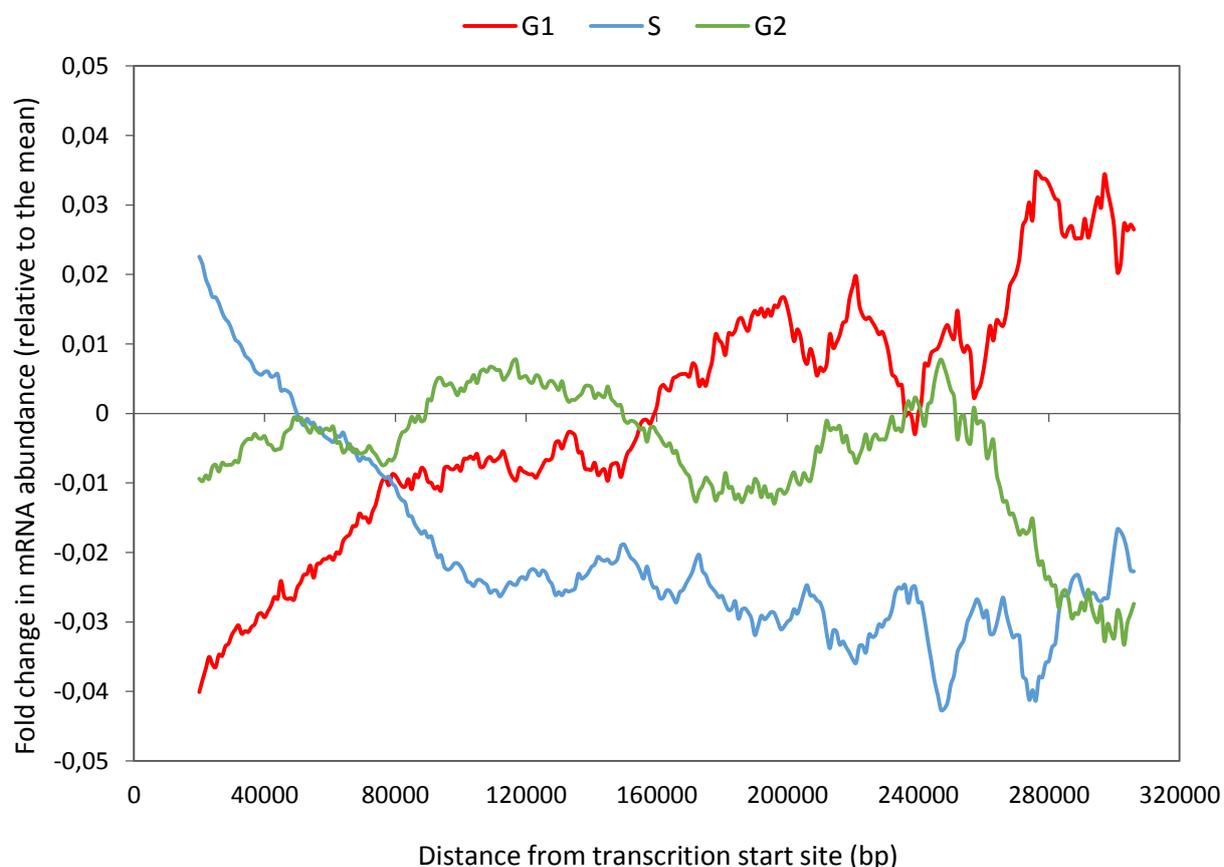
MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1

	G1			S			G2/M		
	# reads	% of Total	% of mapped	# reads	% of Total	% of mapped	# reads	% of Total	% of mapped
Total reads	44452981			44514247			44509671		
Total mapped	32152658	72%		32066826	72%		32141756	72%	
/ Mapped on transcripts	8894823	20%	28%	8775527	20%	27%	8950637	20%	28%
/ No feature	15764989	35%	49%	15390890	35%	48%	15704127	35%	49%
/ Multi-Match	7492696	17%	23%	7900278	18%	25%	7486819	17%	23%
		% of mapped on Transcripts			% of mapped on Transcripts			% of mapped on Transcripts	
// Mapped on mRNAs	8811267	99%		8678295	99%		8861014	99%	
// Mapped on ncRNAs	83556	1%		97232	1%		89623	1%	

Las siguientes tablas suplementarias (S2 Table, S3 Table y S4 Table) son de mayor expansión y se presentan como planilla de datos en formato digital.

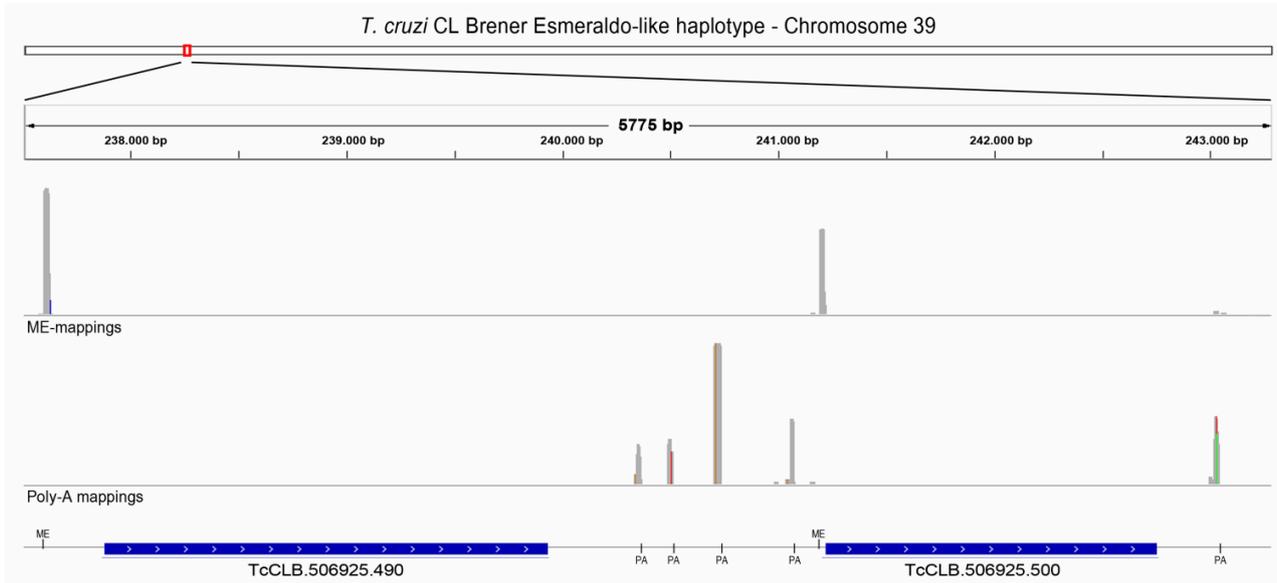
Figura suplementaria 1



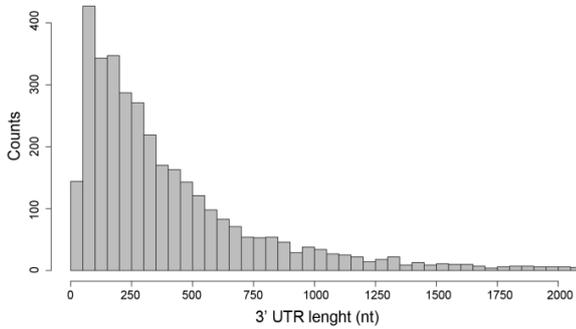
S1 Fig. Influence of the gene localization in the polycistronic unit on cell-cycle expression. In this analysis, a sliding window of 40 kbp was moved in 1 kbp steps in the direction of transcription, away from the determined transcription initiation sites. In each step the mean mRNA abundance of all genes occurring within the 40 kb window (across all transcription units) was calculated for each cell cycle stage. The fold change for each cell cycle phase versus the mean of all three phases was calculated and plotted versus the distance from transcription initiation site. Windows containing fewer than 200 genes were not considered for this study.

Figura suplementaria 2

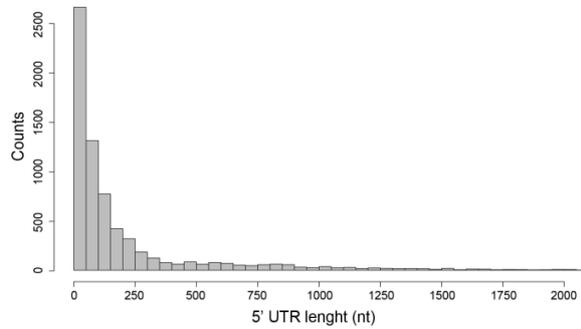
A



B

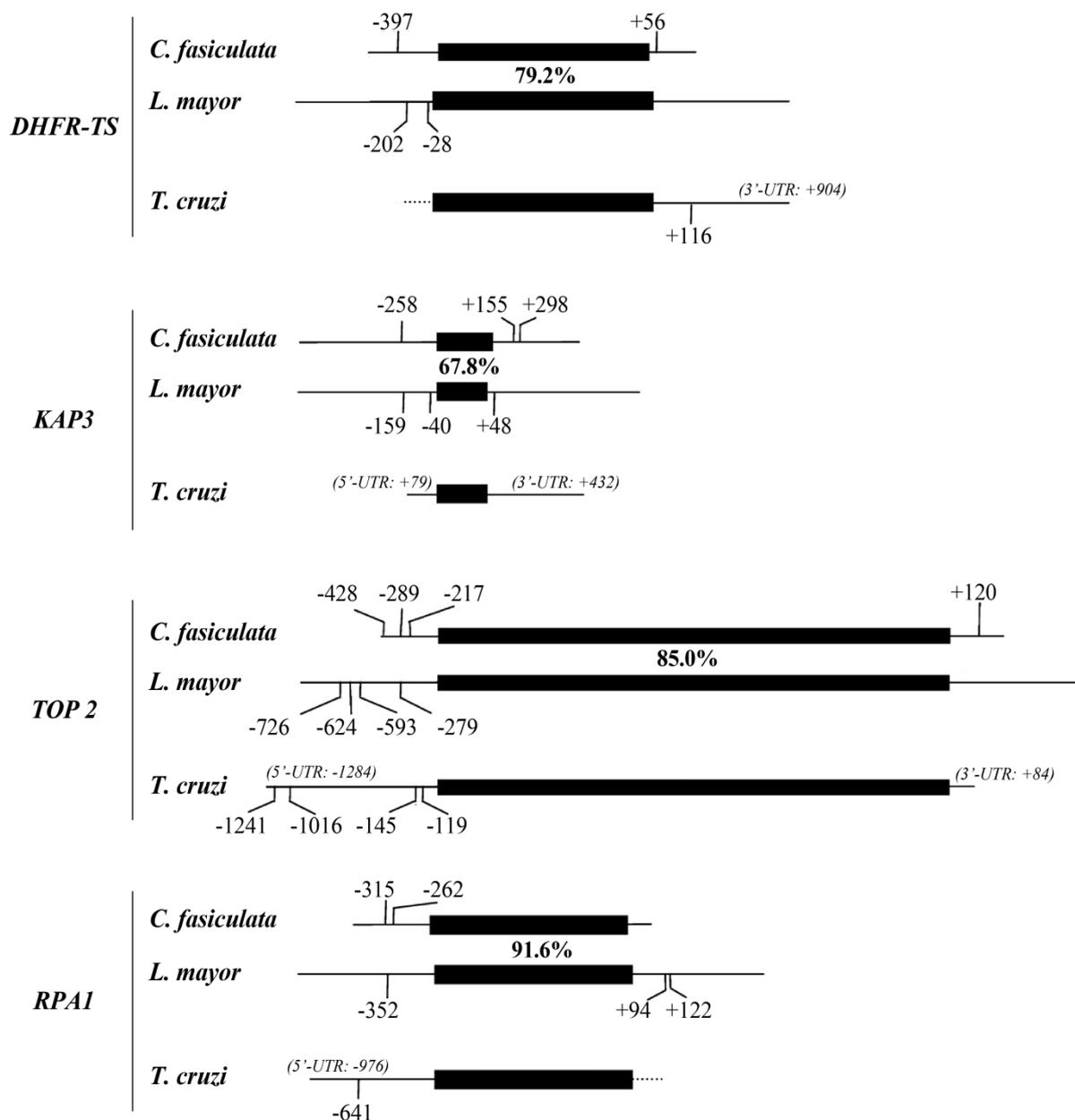


C



S2 Fig. Determination and length distribution of the UTRs. A. Schematic representation of the mapping of the mini-exon (ME) and poly-A (PA) reads on the genome browser. B and C. Histogram representation of the UTR size distribution.

Figura suplementaria 3



S3 Fig. CS-element presence on previously studied genes for *T. cruzi* and related organisms. Figure 1 from Zick et al, 2005 was taken and modified to include the description of the CS-element on the *T. cruzi* orthologues genes. The motif was searched on the experimentally determined UTRs whenever possible (the UTR size is presented in brackets). For DHFR-TS and RPA1 we were not able to describe the 5'-UTR and 3'-UTR respectively, and the motif search was made on a putative UTR sequence consisting on 100 bp upstream of the AUG codon for DHFR-TS and 100 bp downstream of the STOP codon for RPA1 (in both cases represented as a dotted line). We avoided extending those putative UTRs because the next gene was located closer than 300 bp in both cases.

CONCLUSIONES

En este apartado mencionamos las conclusiones más importantes de esta tesis, que son discutidas en forma similar en la discusión del artículo en inglés que ha sido sometido a revisión.

5.1 – Sincronización de cultivos y preparación del ARN.

Se llevó adelante la sincronización de cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* y se obtuvieron poblaciones de parásitos con en el entorno de un 70% de pureza para cada una de las etapas de ciclo. Este grado de pureza obtenido, conjunto con la metodología implementada posteriormente permite la detección de varios cambios en la expresión génica a nivel de los niveles estacionarios de ARN mensajero, lo que fue determinado por PCR cuantitativo de cuatro genes. Verificamos así el aumento de expresión en fase S para dos transcritos de histonas, así como también se observó el perfil de expresión esperado para dos transcritos de ciclinas de las cuales se contaba con datos funcionales previos. Los mismos fueron analizados en tres réplicas independientes, que mostraron que las diferencias observadas en los niveles de transcritos son estadísticamente significativas. Cabe sin embargo la posibilidad de que genes cuyo cambio es menor aunque significativo, no sean detectados. Para resolver esta problemáticas se podría intentar la purificación de los parásitos en cada etapa del ciclo por elutriación (este equipamiento no está disponible en Uruguay), o la clasificación de células asistida por marcadores fluorescentes, ambas metodologías que pueden alcanzar niveles mayores de pureza que los obtenidos en nuestro trabajo (Archer et al. 2011).

A pesar de que la sincronización con hidroxurea produce un ciclo post-lavado de la droga que es relativamente “perturbado”, en contraposición al ciclo natural o no-perturbado, hay muchas evidencias que indican que la progresión de ciclo post-hidroxurea es comparable a la del ciclo natural (Spellman et al. 2004). En fuerte apoyo a esta hipótesis, las ontologías enriquecidas en cada fase del ciclo celular analizada, se corresponden adecuadamente a los principales procesos moleculares que caracterizan a cada una de ellas. Al igual que para el caso anterior, podrían usarse métodos alternativos de separación de fases del ciclo celular a fin de confirmar hallazgos particulares.

5.2 – Secuenciación masiva de los ARNs del ciclo celular.

Se obtuvieron alrededor de 40 millones de lecturas de alta calidad mediante de secuenciado masivo de los ARN poli-adenilados de cada fase del ciclo. Luego del mapeo y filtrado obtuvimos 8 millones de lecturas de conteo único en el genoma y que mapearon sobre los transcriptos anotados en el haplotipo esmeraldo de la cepa CL-brener de *T. cruzi*. Para el 76% de los transcriptos codificantes para ARNm (7860 de 10342), fuimos capaces de determinar el nivel de expresión génica con confianza mediante nuestra metodología. Utilizando análisis de correlación en nuestros datos observamos que durante el ciclo celular el transcriptoma en estado estacionario solo sufre leves alteraciones, lo cual implica que la mayoría de los genes mantienen niveles estables a lo largo del ciclo, o sufren cambios de poca magnitud. Si bien es posible que un grupo de genes de bajo niveles de cambios no hayan sido detectados debido al porcentaje de pureza alcanzado, el aboradaje realizado detecta los genes de mayor amplitud de cambio.

5.3 – Identificación de los genes regulados en el ciclo celular de epimastigotas.

Empleando un paquete estadístico diseñado para el análisis de datos transcriptómicos identificamos 305 genes cuyos niveles se ven alterados significativamente (p -valor < 0.01 y cambio mayor a 1.5) en alguna de las tres transiciones del ciclo celular (de G1 hacia S, de S hacia G2/M y de G2/M hacia G1). Clasificamos a estos genes según la etapa donde se ve su máximo nivel de expresión y de esta forma obtuvimos 70, 97 y 138 genes con pico de expresión en G1, S y G2/M respectivamente. Por análisis de ontología génica observamos que los grupos de genes regulados al alta en cada fase son componentes de los procesos centrales que ocurren en cada etapa. En breve, los genes de G1 muestran funciones relacionadas al metabolismo energético, los genes de fase S están representados por proteínas involucradas en la replicación del material genético y finalmente en los genes de G2/M se ven funciones relacionadas a la formación del huso mitótico y la organización de los organelos para la división.

De esta forma podemos afirmar que la metodología empleada en este estudio permitió la correcta identificación de transcriptos periódicamente regulados. Asimismo, podemos afirmar que el control de la abundancia de los ARNm es utilizado por *T. cruzi* para regular los procesos relacionados a la progresión del ciclo celular.

5.4 – Análisis comparativo del ciclo celular en otras especies.

Dado que existen estudios similares al nuestro realizados en *T. brucei*, en *S. cerevisiae* y en células humanas, llevamos a cabo análisis comparativos con estas especies. Para el subgrupo de genes ortólogos entre *T. cruzi* y *T. brucei*, levaduras y humanos obtuvimos un total de 75 (30% de 247), 33 (34% de 97) y 28 (24% de 117) genes respectivamente que resultaron ser genes regulados en el ciclo celular en ambos organismos. Por lo tanto fuimos capaces de identificar un grupo de genes para los cuales ya estaba demostrada la periodicidad en sus niveles de ARNm durante el ciclo celular, lo cual nos provee de una validación de nuestra lista de genes regulados.

Por otro lado, el bajo nivel de coincidencia obtenido con *T. brucei* podría ser indicativo de las relevantes diferencias biológicas que existen entre estos dos organismos, tanto sea en los mecanismos parasitarios o incluso diferencias en la cronología de ciertos eventos que se dan a lo largo del ciclo proliferativo (Elias et al. 2007; Elias et al. 2009). Sin embargo, las diferencias metodológicas entre el trabajo en *T. brucei* y el nuestro podrían también aportar a la baja coincidencia y a los desfases observados.

Este análisis nos permitió resaltar también las diferencias en las moléculas involucradas en el ciclo celular entre *T. cruzi* y en particular el hospedero humano. Pudimos determinar que la mayoría de los genes regulados en *T. cruzi* (62%, 188 de los 305) no presentan un homólogo directo en humanos. Esto, sumado a la baja coincidencia observada (24%), sería indicativo de la divergencia presente entre los mecanismos que operan en el hospedador y en el parásito. Por lo tanto, este es un punto de particular de interés al momento de encontrar características distintivas que se puedan tomar para el desarrollo de fármacos que actúen específicamente sobre el patógeno y no generen efectos adversos en el paciente.

5.5 – Determinación de la complejidad de la regulación de los niveles de ARNm periódicos mediante meta-análisis.

Como parte de un esfuerzo para estudiar qué tipo de patrones generales de expresión génica estarían involucrados en generar la periodicidad en los genes del ciclo celular, comparamos nuestros datos con los datos de dos estudios recientes de genómica funcional en *T. cruzi*. Tanto el transcriptoma de la compartimentalización núcleo-citoplasma (Pastro et al. 2016, en preparación) como el estudio traductómica en la transición de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos (Smircich et al. 2015), son trabajos realizados recientemente en nuestro grupo.

En primer lugar, encontramos que los genes del ciclo celular resultaron significativamente enriquecidos en el grupo de genes diferencialmente localizados en el citosol (enriquecimiento de 2.0), donde los genes de G1 mostraron más fuertemente este enriquecimiento (3.3 veces). Esto nos sugiere que en epimastigotas replicativos los transcritos de los genes del ciclo probablemente estarían siendo transportados activamente al citosol, o al menos serían diferencialmente estabilizados al ser exportados del núcleo en comparación con el promedio de los transcritos sintetizados en el parásito.

Respecto a las listas de expresión diferencial de la transición epimastigotas a metacíclicos, observamos que los genes del ciclo celular están significativamente sobre-representados tanto en los transcritos regulados al alta en epimastigotas para los niveles estacionarios de mensajeros (enriquecimiento de 3.4), como para los transcritos que están activamente siendo traducidos (traductoma), donde el enriquecimiento observado es incluso mayor (enriquecimiento de 4.6). En este estudio notamos que los transcritos de genes de fase S son los que muestran mayores enriquecimientos dentro de los genes del ciclo. Esto valida nuestros datos, y en particular nuestra descripción de los genes asociados a la replicación, dado que analizamos la transición de un estadio proliferante a uno quiescente donde se espera que las transcritos relacionados al proceso replicativo estén reguladas a la baja. Esto efectivamente se observó al notar la ausencia de genes de fase S en la lista de genes regulados al alta en tripomastigotas metacíclicos (0.14 de enriquecimiento). Esto sugiere que los genes de ciclo celular estarían siendo regulados en la transición hacia tripomastigotas como parte del ciclo de vida de *T. cruzi*, tanto a nivel de la abundancia de sus transcritos como a nivel de la traducción.

Estos análisis muestran que los transcritos periódicos están al menos sometidos a diferentes tipos de regulación post-transcripcional. Sería interesante estudiar el peso relativo de estos mecanismos en la expresión global de los genes periódicos, en comparación con los organismos eucariotas que utilizan el control transcripcional, ausente en los tripanosomátidos.

5.6 – Análisis composicional y estructural en los genes del ciclo celular

Dentro de las serie de características a estudiar, en una primera instancia analizamos el uso de codones, con la idea de estudiar si esto podría contribuir a la buena traducibilidad observada en los datos de traductómica. Observamos que los genes del ciclo tienen valores de CAI significativamente más altos que la media de los genes expresados en *T. cruzi* lo que podría significar que la optimización del uso de codones podría en parte contribuir a la mejor traducibilidad de estos genes. Los valores de CAI muestran una correlación con los niveles de expresión de los genes, que también resultaron ser

mayores que la media de expresión del genoma. Por otro lado examinamos el contenido GC y GC3 (contenido GC en la tercera posición del codón) dado que existen antecedentes que sugieren que el contenido GC puede estar relacionado con el nivel de expresión de los genes. En este caso también observamos un aumento estadísticamente significativo respecto a la media de los genes en estas variables y en conjunto con la observación previa, nuestros datos apuntan a que la composición de bases podría estar contribuyendo a la regulación conjunta de los genes del ciclo celular en epimastigotas.

Considerando que existen datos que muestran que el tamaño de las UTRs puede estar relacionado con los niveles de expresión génica (Kozak 1987; Willis 1999), investigamos la extensión de estas regiones en los genes del ciclo celular. Para esta etapa comenzamos por la determinación de las regiones UTR en los genes de *T. cruzi* utilizando nuestros datos de transcriptómica, dado que había muy pocos datos de este tipo hasta el momento. Obtuvimos 14649 UTRs 5' distribuidas en 6678 genes (2.2 UTRs por gen), y en el caso de las UTRs 3' determinamos 13362 para 3718 genes (3.6 UTRs per gen) con tamaños similares a los descritos previamente por otros estudios (Brandao 2008; Campos et al. 2008). En particular, observamos una tendencia en los genes del ciclo a presentar UTRs 5' y 3' más largas que los genes no regulados. Esta tendencia se hizo más evidente en el caso de los genes de G2/M, donde ambas UTRs mostraron un aumento estadísticamente significativo respecto a los genes no regulados. Existen antecedentes en genes relacionados a la mitosis que describen UTRs de larga extensión en las que se posibilita la formación de estructuras secundarias (Pickering et al. 2005). Los autores proponen el silenciamiento traduccional como un mecanismo regulatorio que trabajaría en estos genes y sería un línea de investigación interesante a seguir en *T. cruzi*.

Se estudió la correlación entre la ubicación de los genes dentro del policistrón y la expresión en el ciclo celular y se observó que los genes del ciclo tienden a posicionarse más distalmente en los policistrones respecto al promedio de los genes. También se realizó el estudio de cambio en la expresión génica dependiente de la distancia al inicio del policistrón para la totalidad de los genes de *T. cruzi*, donde se observó que la abundancia de los transcritos en fase G1 aumenta junto con la distancia al inicio del policistron al momento que disminuye para fase S. De esta forma se corroboraron los resultados observados en *T. brucei* previamente (Kelly et al. 2012), confirmando que la organización génica también es un factor que influye en la expresión diferencial de los genes en el ciclo celular. Asimismo, esta observación contribuye a la justificación de la alta sintenia entre estos organismos que están evolutivamente alejados.

5.7 – Análisis de potenciales motivos de RNA en los genes del ciclo celular

Para la modulación en conjunto de genes que presentan perfiles similares de expresión, muchas veces se utilizan motivos conservados en las regiones UTRs de los transcritos, los cuales posibilitan el reconocimiento específico de proteínas reguladoras de la expresión génica (De Gaudenzi et al. 2011). Por este motivo quisimos investigar la existencia de elementos conservados en las UTRs. Para esto, primero generamos sub-grupos de genes co-regulados dentro de los 305 genes regulados, mediante análisis de *clustering*. De esta forma obtuvimos 7 sub-grupos de genes que muestran perfiles de expresión similares entre sí, y cada sub-grupo fue interrogado en búsqueda de motivos tanto estructurales como de secuencia primaria.

En dos subgrupos, principalmente compuestos por genes de fase S, detectamos la presencia de un motivo de secuencia enriquecido significativamente en las regiones 3' UTR (c/a/uCAUAGA), que se asemeja mucho al octámero denominado elemento-CS (de *cycling-sequence*) descrito inicialmente en *C. fasciculata* (Mitra et al. 2003). Si bien generalmente en las regiones 3' es donde se concentran la mayor parte de los elementos en *cis* reguladores que puedan interactuar con proteínas de unión al ARN para regular sus niveles (De Gaudenzi et al. 2013; Vindry et al. 2014), el elemento-CS había sido previamente descrito en las 5' UTRs de transcritos cuyas proteínas mostraban niveles periódicos, presentando una diferencia que sugiere que probablemente la regulación por este elemento sea diferente en estos organismos. Finalmente, la alta cobertura con la cual se identificó este elemento sería un indicativo de que probablemente los genes que lo portan dependan de su presencia para lograr la expresión periódica a lo largo del ciclo de *T. cruzi*.

Por otro lado, también logramos identificar varios motivos estructurales enriquecidos tanto en las 3' como en las 5' UTRs en 6 de los 7 subgrupos de genes co-regulados. En este caso la mayoría de los motivos se localizan en los 5' UTRs y todos comparten la arquitectura de tipo tallo-bucle. Esta ubicación podría ser indicativa de una posible función en la modulación traduccional, que por ejemplo permite regular la accesibilidad de factores de la traducción al transcrito. Esto es otra evidencia a favor de que la regulación a nivel de la traducibilidad puede estar siendo de gran importancia para modular los niveles de proteínas del ciclo celular.

PERSPECTIVAS

6.1 – Validación de cambios en amastigotas.

El estadio replicativo de interés clínico en *T. cruzi* es el amastigota, que cumple su ciclo proliferativo en el interior de las células infectadas en el hospedero mamífero. Puesto que el cultivo y aislamiento de este estadio presenta una importante dificultad, la gran mayoría de los estudios se realizan en epimastigotas. Sin embargo, es valioso trasladar estos estudios a los amastigotas y es así que proponemos dos alternativas para la validación de los cambios en los niveles de transcripto en genes que resulten de interés en este estadio:

1) Estudio por hibridación *in situ* de sondas dirigidas a los ARNm a estudiar. En esta aproximación se pretende analizar el perfil de expresión génica en amastigotas que repliquen en el citoplasma de células mamíferas infectadas en cultivo. Se diseñarían sondas que hibriden con los diferentes ARNm a analizar y se realizaría una cuantificación de la señal para un grupo importante de células interrogadas. En paralelo se realizaría una tinción con DAPI para revelar la multiplicidad de núcleos y kinetoplastos junto con una tinción por inmuno-fluorescencia contra una proteína flagelar para evidenciar la aparición del flagelo (Duhagon et al. 2009; Chavez 2012). Con la información recaudada a través de estos marcadores se podría inferir la ubicación en el ciclo cada parásito y por lo tanto se podría cuantificar el nivel relativo del transcripto de interés en cada etapa del ciclo celular.

2) La sincronización en cultivos de amastigotas axénicos. Existe la posibilidad de trabajar con formas del parásito similares a amastigotas que se cultivan en un medio libre de células de mamífero (Engel et al. 1988; Contreras et al. 2002), y se denominan “axénicas”, porque son cultivos puros de solamente un tipo celular. Luego de que se lleva a cabo la producción de amastigotas *in-vitro*, los parásitos obtenidos muestran una breve fase lag, donde la mayoría de las células se encuentran detenidas en G1, y luego progresan por el ciclo celular de una forma semi-sincrónica. Este fenómeno se podría aprovechar para en una primera instancia recuperar poblaciones enriquecidas cada etapa del ciclo. De no alcanzarse los niveles de pureza necesarios, se podría acoplar una sincronización por hidroxiaurea posterior a la amastigogénesis *in vitro*, de modo de obtener poblaciones con un mayor grado de enriquecimiento que lo que se observa en el proceso natural. Luego se procedería a extraer ARN de los parásitos sincronizados y se realizarían análisis mediante qRT-PCR para estudiar los patrones de expresión de los genes de interés específicos.

Ambas aproximaciones presentan una serie de dificultades y limitaciones. En el caso de la primera opción, los desafíos están en la puesta a punto de la técnica y en el riguroso análisis posterior. Para la segunda opción, debemos tener en cuenta el alcance y la relevancia que los resultados obtenidos en cultivos axénicos tienen, al ser un modelo del amastigota típico que prolifera y se divide en un ambiente relativamente diferente.

El aislamiento de amastigotas de dentro de las células de mamífero y su subsiguiente clasificación celular asistida por fluorescencia basada en contenido de ADN por tinción como el yoduro de propidio es teóricamente posible, pero esto probablemente resulte en un bajo rendimiento debido a las limitaciones de la cantidad de parásitos que pueden obtenerse en estos cultivos y la contaminación de los cultivos con restos de células humanas.

6.2 – Regulación a nivel de traducibilidad de los ARNm del ciclo celular.

Dado la importancia del control post-transcripcional de la expresión génica en estos organismos y considerando que los datos obtenidos en nuestro estudio sugieren claramente la posible participación de los mecanismos de regulación a nivel de la traducibilidad de los transcritos involucrados en el ciclo celular de *T. cruzi*, surge el interés de llevar adelante estudios de traductómica (*ribosome profiling*) en poblaciones de parásitos sincronizados. En breve, la estrategia a utilizar para este estudio consiste en la secuenciación de los fragmentos de ARNm protegidos por el ribosoma y la secuenciación de modo masivo de los mismos. En primer lugar se incuban los parásitos con cicloheximida (inhibidor de la elongación traduccional) para inmovilizar los ribosomas sobre el mensajero que están traduciendo. Luego se purifica la fracción poliribosomal mediante la sedimentación en gradientes de sacarosa. Se realiza una digestión controlada de las regiones del transcripto que no están unidas al ribosoma y se purifica los fragmentos de ARNm de aproximadamente 28-30 nucleótidos. Se secuencian estos fragmentos y se mapean a los transcritos, lo cual permite estimar una tasa traduccional sobre cada mensajero que este siendo expresado en el parásito al momento del análisis. Esta estrategia fue empleada recientemente por nuestro grupo (Smircich et al. 2015) y hemos analizado algunos experimentos preliminares en el ciclo celular. Así como el transcriptoma presenta una primer imagen en el proceso de expresión génica, el traductoma nos acerca un poco más a la cantidad de proteína que se está produciendo para cada gen y por lo tanto presenta mejores niveles de correlación con datos de niveles de proteínas (Ingolia et al. 2009; Smircich et al. 2015).

En forma complementaria sería ideal realizar el análisis del proteoma en el ciclo celular y comparar la importancia relativa de cada proceso, así como identificar los grupos de genes regulados específicamente por cada mecanismo.

6.3 – Anotación de UTRs y estudio de variantes de procesamiento.

Como parte del trabajo presentado se realizó una caracterización inicial de las regiones UTRs en el estadio epimastigota. Las lecturas solapantes con la región 5' del mini-exón y las lecturas que portaban tracts de poli-A hacia el extremo 3' se utilizaron para determinar los sitios de TRANS-splicing y poliadenilación respectivamente a un nivel ómico. Solamente utilizando las lecturas obtenidas en este trabajo no se obtiene la cobertura suficiente sobre un gran número de genes como para proponer con certeza los sitios correctos de procesamiento. Esto fue en parte agravado por la frecuente observación de largos tracts de adeninas en las regiones inter-CDS, lo cual nos imposibilita a asignar con certeza un sitio de poliadenilación en esas regiones, dado que no se puede discriminar si el tracto de poli-A observado en la lectura de secuenciación proviene de la poliadenilación del ARNm maduro o si es de origen genómico. De modo que para avanzar hacia mejorar la anotación de las regiones UTRs nos proponemos 2 alternativas. Por un lado, existe la posibilidad de utilizar los datos recabados por varios trabajos de transcriptómica realizados recientemente en nuestro laboratorio para lograr acumular evidencia experimental para cada sitio anotado. Al mismo tiempo, se puede trabajar en mejorar aspectos relacionados al *pipeline* bioinformático que se utiliza para la detección de los sitios. La segunda alternativa involucra el diseño de un nuevo experimento de secuenciación masiva en el que se purifican los extremos 5' y/o 3' de los ARNm para aumentar la cobertura de estas regiones y acumular más lecturas que soporten la determinación de cada sitio de procesamiento. Este tipo de estrategia fue empleada para el estudio de los sitios de *TRANS-splicing* en *T. brucei* por Nilsson y colaboradores en 2010 obteniéndose resultados de gran relevancia en el estudio de la participación de la regulación por procesamiento en los tripanosomátidos (Nilsson et al. 2010).

Para la determinación de las UTRs realizada en este trabajo se utilizaron los datos de los tres estadios del ciclo celular en conjunto con el objetivo de determinar a una escala general todos los sitios posibles utilizados en epimastigotas, contando con la mayor profundidad de secuenciación posible. Sin embargo, también es interesante estudiar si existen cambios en la selección de los sitios de procesamiento que generen transcriptos alternativos para distintas etapas del ciclo celular. Muy probablemente se obtendrían resultados confiables solo para el subgrupo de genes de alta expresión

debido a que la profundidad de la secuenciación empleada en este trabajo no es suficiente para lograr una alta cobertura sobre transcritos de media y baja expresión.

6.4 – Estudio de señales en *cis* y de posibles moléculas moduladoras

Una vez identificados los motivos consenso que son comunes a los grupos de genes potencialmente co-regulados a lo largo del ciclo celular, se podrá pasar a realizar experimentos que permitan demostrar la contribución de estos motivos al perfil de expresión de genes que los portan. Para esto, se debería clonar las regiones UTRs de los genes seleccionados y generar mutantes en los motivos para luego realizar ensayos de genes reporteros en los que se puede estudiar el efecto sobre a periodicidad de la expresión de transcritos individuales (Pastro et al. 2013). El mismo ensayo puede realizarse también empleando el sistema de CRISPR para mutar el motivo conservado en el gen endógeno en lugar de en un reportero (Peng et al. 2014).

Otra perspectiva de este trabajo a futuro consiste en identificar la o las proteínas que interaccionarían con los motivos encontrados. La estrategia de purificación por cromatografía de afinidad y *crosslinking* con luz UV y posterior identificación por espectrometría de masas también ha sido implementada con éxito en nuestro grupo para capturar proteínas de unión a ARNs (Duhagon et al. 2009). Posteriormente se puede expresar en forma recombinante la proteína y mutantes de la misma que nos permitan validar el reconocimiento de la secuencia y la modulación de los transcritos del ciclo a través de ensayos de EMSA (de *electrophoretic mobility shift assay*) y ensayos de *Pull-down* para ARNs. En caso de identificarse una proteína de unión al ARN involucrada directamente en la regulación de la expresión génica durante el ciclo, resultaría interesante generar una líneas de parásitos que sobre-expresen esta proteína y estudiar el efecto observado en los cultivos de parásitos, pudiéndose analizar mediante citometría de flujo las posibles efectos en el desarrollo normal del ciclo celular. Eventualmente, como una perspectiva futura, se podría intentar la generación de líneas *knock-out* (KO) donde se podrá estudiar la esencialidad de este gen en un primer lugar, de ser cultivos viables se puede estudiar el fenotipo de estos parásitos tanto mediante curvas de crecimiento como por análisis de citometría y finalmente se podría evaluar los cambios en los niveles de los genes blancos donde está presente el motivo regulador. Parte de estos estudios se han hecho en *C. fasciculata* para las proteínas de unión al motivo CS (CSBPs), las cuales son en sí mismas de expresión periódica y además sustratos de fosforilación periódica (Mittra et al. 2004), sin embargo aún se desconoce por completo el mecanismo por el cual controlan a los ARNm que reconocen.

6.5 – Identificación de blancos moleculares para terapia farmacológica

Con vistas a contribuir con la búsqueda de nuevos blancos farmacológicos para un mejor tratamiento de la enfermedad, la lista de genes con expresión diferencial se puede escanear para interrogar proteínas susceptibles de inhibición farmacológica. Se planifica utilizar la base de datos TDR Targets, que ha sido específicamente diseñada para la identificación y priorización de blancos moleculares para enfermedades desatendidas tropicales (Magarinos et al. 2012). Esta base integra información funcional de los genes, como ser datos de expresión génica, filogenia y esencialidad. En la búsqueda de posibles blancos el usuario puede asignar una valoración de cada característica de forma de generar un ranking donde los candidatos a blancos interesantes tengan un mayor puntaje. Por otro lado, esta base también integra datos sobre la estructura química, la actividad y propiedades de ligandos biológicos, drogas e inhibidores de varios tipos. De esta forma se puede valorar la interacción entre las pequeñas moléculas y los blancos seleccionados, ya sea por un vínculo conocido o datos predichos sobre la interacción. Los resultados de estos análisis nos pueden llevar al reconocimiento de blancos drogables o accionables, que prometen mejores resultados en lo que sería una estrategia racional para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos.

6.6 – Estudiar la función de proteínas específicas-reguladoras del ciclo celular

Este trabajo identifica por primera vez varias proteínas que podrían por su ontología participar en la regulación del ciclo celular en *T. cruzi*, incluidas ciclinas, kinasas dependientes de ciclina y proteínas que participan en puntos de control del ciclo celular. La mayoría de ellas aún no han sido caracterizadas a nivel molecular. De modo similar, aparecen entre los transcritos periódicos un importante número de proteínas hipotéticas. Para estos dos grupos de genes, se podría estudiar la participación en el ciclo proliferativo a diferentes niveles, a través del estudio más detallado de su expresión, tanto a nivel de ARNm como proteína, la pérdida o ganancia de función, y el estudio de las vías moleculares que afectan específicamente, lo cual dependerá de cada proteína en particular.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ackermann, A. A., L. G. Panunzi, R. O. Cosentino, D. O. Sanchez and F. Agüero (2012). "A genomic scale map of genetic diversity in *Trypanosoma cruzi*." *BMC Genomics* **13**: 736.
- Agabian, N. (1990). "Trans splicing of nuclear pre-mRNAs." *Cell* **61**: 1157-60.
- Alves, L. R., C. Oliveira and S. Goldenberg (2015). "Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*." *BMC Microbiol* **15**: 104.
- Aphasizhev, R. and I. Aphasizheva (2011). "Mitochondrial RNA processing in trypanosomes." *Res Microbiol* **162**(7): 655-63.
- Archer, S. K., D. Inchaustegui, R. Queiroz and C. Clayton (2011). "The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*." *PLoS One* **6**: e18425.
- Archer, S. K., V. D. Luu, R. A. de Queiroz, S. Brems and C. Clayton (2009). "*Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle." *PLoS Pathog* **5**(8): e1000565.
- Aslett, M., C. Aurrecochea, M. Berriman, J. Brestelli, B. P. Brunk, M. Carrington, et al. (2010). "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." *Nucleic acids research* **38**: D457-62.
- Aurrecochea, C., J. Brestelli, B. P. Brunk, S. Fischer, B. Gajria, X. Gao, et al. (2010). "EuPathDB: a portal to eukaryotic pathogen databases." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D415-9.
- Ávila, A. R., B. Dallagiovanna, S. F. Yamada-Ogatta, V. Monteiro-Góes, S. P. Fragoso, M. A. Krieger, et al. (2003). "Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." *Genetics and Molecular Research* **2**: 159-168.
- Bangs, J., P. Crain, T. Hashizume, J. McCloskey and J. Boothroyd (1992). "Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides." *J. Biol. Chem.* **267**: 9805-9815.
- Benabdellah, K., E. Gonzalez-Rey and A. Gonzalez (2007). "Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein." *Mol Microbiol* **65**(6): 1559-67.
- Benne, R., J. Van den Burg, J. P. Brakenhoff, P. Sloof, J. H. Van Boom and M. C. Tromp (1986). "Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA." *Cell* **46**(6): 819-26.
- Berckmans, B. and L. De Veylder (2009). "Transcriptional control of the cell cycle." *Curr Opin Plant Biol* **12**(5): 599-605.
- Bermudez, J., C. Davies, A. Simonazzi, J. Pablo Real and S. Palma (2016). "Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease." *Acta Trop* **156**: 1-16.
- Berriman, M., E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renaud, D. C. Bartholomeu, et al. (2005). "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." *Science* **309**: 416-22.
- Bertoli, C., J. M. Skotheim and R. A. de Bruin (2013). "Control of cell cycle transcription during G1 and S phases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(8): 518-28.
- Branche, C., S. Ochaya, L. Aslund and B. Andersson (2006). "Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and biochemical parasitology* **147**: 30-8.
- Brandao, A. (2008). "Trypanosomatid EST: a neglected information resource regarding flagellated protozoa?" *Mem Inst Oswaldo Cruz* **103**(6): 622-6.
- Calderano, S., P. Godoy, D. Soares, O. A. Sant'Anna, S. Schenkman and M. C. Elias (2014). "ORC1/CDC6 and MCM7 distinct associate with chromatin through *Trypanosoma cruzi* life cycle." *Mol Biochem Parasitol* **193**(2): 110-3.
- Calderano, S. G., P. D. de Melo Godoy, M. C. M. Motta, R. a. Mortara, S. Schenkman and M. C. Elias (2011). "*Trypanosoma cruzi* DNA replication includes the sequential recruitment of pre-replication and replication machineries close to nuclear periphery." *Nucleus (Austin, Tex.)* **2**: 136-145.

- Campos, P. C., D. C. Bartholomeu, W. D. DaRocha, G. C. Cerqueira and S. M. Teixeira (2008). "Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*." Int J Parasitol **38**(12): 1383-9.
- Clayton, C. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." EMBO Journal **21**: 1881-1888.
- Contreras, V. T., M. C. Navarro, A. R. De Lima, R. Arteaga, F. Duran, J. Askue, et al. (2002). "Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(8): 1213-20.
- Coura, J. R. (2007). "Chagas disease: what is known and what is needed--a background article." Mem Inst Oswaldo Cruz **102 Suppl 1**: 113-22.
- Coura, J. R. and J. Borges-Pereira (2010a). "Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review." Acta Trop **115**(1-2): 5-13.
- Coura, J. R. and P. A. Vinas (2010b). "Chagas disease: a new worldwide challenge." Nature **465**(7301): S6-7.
- Chagas, C. (1909). "Nova Tripanosomíaze Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico da nova entidade mórbida do homem." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz: 159-219.
- Chavez, S. (2012). Aproximación a la genómica funcional del ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*. Laboratorio de Interacciones Moleculares. Montevideo, UdelaR.
- Cho, R. J., M. J. Campbell, E. A. Winzeler, L. Steinmetz, A. Conway, L. Wodicka, et al. (1998). "A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle." Mol Cell **2**(1): 65-73.
- da Cunha, J. P. C., E. S. Nakayasu, M. C. Elias, D. C. Pimenta, M. T. Téllez-Iñón, F. Rojas, et al. (2005). "Trypanosoma cruzi histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle." Molecular and biochemical parasitology **140**: 75-86.
- De Gaudenzi, J. G., S. J. Carmona, F. Agüero and A. C. Frasch (2013). "Genome-wide analysis of 3'-untranslated regions supports the existence of post-transcriptional regulons controlling gene expression in trypanosomes." PeerJ **1**: e118.
- De Gaudenzi, J. G., I. D'Orso and A. C. C. Frasch (2003). "RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo." The Journal of biological chemistry **278**: 18884-94.
- De Gaudenzi, J. G., G. Noe, V. A. Campo, A. C. Frasch and A. Cassola (2011). "Gene expression regulation in trypanosomatids." Essays Biochem **51**: 31-46.
- de Godoy, L. M., F. K. Marchini, D. P. Pavoni, C. Rampazzo Rde, C. M. Probst, S. Goldenberg, et al. (2012). "Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis." Proteomics **12**(17): 2694-703.
- De Lange, T., P. A. Michels, H. J. Veerman, A. W. Cornelissen and P. Borst (1984). "Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence." Nucleic acids research **12**: 3777-90.
- De Souza, W. (2002). "Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*." Current pharmaceutical design **8**: 269-285.
- Di Renzo, M. A., M. Laverriere, S. Schenkman, D. P. Wehrendt, M. T. Tellez-Inon and M. Potenza (2015). "Characterization of TcCYC6 from *Trypanosoma cruzi*, a gene with homology to mitotic cyclins." Parasitol Int **65**(3): 196-204.
- Duhagon, M. A., L. Pastro, J. R. Sotelo-Silveira, L. Pérez-Díaz, D. Maugeri, S. C. Nardelli, et al. (2009). "The *Trypanosoma cruzi* nucleic acid binding protein Tc38 presents changes in the intramitochondrial distribution during the cell cycle." BMC microbiology **9**: 34.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, et al. (2005a). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-15.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, et al. (2005b). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." Science **309**: 404-9.
- Elias, M. C., J. P. C. da Cunha, F. P. de Faria, R. a. Mortara, E. Freymüller and S. Schenkman (2007). "Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle." Protist **158**: 147-57.

- Elias, M. C., S. C. Nardelli and S. Schenkman (2009). "Chromatin and nuclear organization in *Trypanosoma cruzi*." Future Microbiol **4**(8): 1065-74.
- Engel, J. C. and J. A. Dvorak (1988). "Trypanosoma cruzi: cell biological behavior of epimastigote and amastigote forms in axenic culture." J Protozool **35**(4): 513-8.
- Eser, P., C. Demel, K. C. Maier, B. Schwalb, N. Pirkl, D. E. Martin, et al. (2014). "Periodic mRNA synthesis and degradation co-operate during cell cycle gene expression." Mol Syst Biol **10**: 717.
- Franzen, O., S. Ochaya, E. Sherwood, M. D. Lewis, M. S. Llewellyn, M. A. Miles, et al. (2011). "Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and comparison with T. cruzi VI CL Brener." PLoS Negl Trop Dis **5**(3): e984.
- Franzen, O., C. Talavera-Lopez, S. Ochaya, C. E. Butler, L. A. Messenger, M. D. Lewis, et al. (2012). "Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies T. cruzi marinkellei." BMC Genomics **13**: 531.
- Galanti, N., J. A. Dvorak, J. Grenet and J. P. McDaniel (1994). "Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida." Experimental cell research **214**: 225-230.
- Gilinger, G. and V. Bellofatto (2001). "Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms." Nucleic acids research **29**: 1556-64.
- Godoy, P. D. D. M., L. A. Nogueira-Junior, L. S. Paes, A. Cornejo, R. M. Martins, A. M. Silber, et al. (2009). "Trypanosome prereplication machinery contains a single functional orc1/cdc6 protein, which is typical of archaea." Eukaryotic cell **8**: 1592-603.
- Gómez, E. B., A. R. Kornblihtt and M. T. Téllez-Iñón (1998). "Cloning of a cdc2-related protein kinase from *Trypanosoma cruzi* that interacts with mammalian cyclins." Molecular and biochemical parasitology **91**: 337-51.
- Gomez, E. B., M. I. Santori, S. Laria, J. C. Engel, J. Swindle, H. Eisen, et al. (2001). "Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins." Mol Biochem Parasitol **113**(1): 97-108.
- Grant, G. D., L. Brooks, 3rd, X. Zhang, J. M. Mahoney, V. Martyanov, T. A. Wood, et al. (2013). "Identification of cell cycle-regulated genes periodically expressed in U2OS cells and their regulation by FOXM1 and E2F transcription factors." Mol Biol Cell **24**(23): 3634-50.
- Grant, K. M. (2008). "Targeting the cell cycle in the pursuit of novel chemotherapies against parasitic protozoa." Current pharmaceutical design **14**: 917-24.
- Grisard, E. C., S. M. Teixeira, L. G. de Almeida, P. H. Stoco, A. L. Gerber, C. Talavera-Lopez, et al. (2014). "Trypanosoma cruzi Clone Dm28c Draft Genome Sequence." Genome Announc **2**(1).
- Guedes, P. M. M., G. K. Silva, F. R. S. Gutierrez and J. S. Silva (2011). "Current status of Chagas disease chemotherapy." Expert review of anti-infective therapy **9**: 609-20.
- Hamilton, P. B., M. D. Lewis, C. Cruickshank, M. W. Gaunt, M. Yeo, M. S. Llewellyn, et al. (2011). "Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding." Infect Genet Evol **11**(1): 44-51.
- Hammarton, T. C. (2007). "Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*." Molecular and biochemical parasitology **153**: 1-8.
- Hammarton, T. C., J. C. Mottram and C. Doerig (2003). "The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation." Progress in cell cycle research **5**: 91-101.
- Harashima, H., N. Dissmeyer and A. Schnittger (2013). "Cell cycle control across the eukaryotic kingdom." Trends Cell Biol **23**(7): 345-56.
- Hummel, H. S., R. D. Gillespie and J. Swindle (2000). "Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing." J Biol Chem **275**(45): 35522-31.
- Ingolia, N. T., S. Ghaemmaghami, J. R. S. Newman and J. S. Weissman (2009). "Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling." Science (New York, N.Y.) **324**: 218-23.
- Inoue, A. H., M. Serpeloni, P. M. Hiraiwa, S. F. Yamada-Ogatta, J. R. Muniz, M. C. Motta, et al. (2014). "Identification of a novel nucleocytoplasmic shuttling RNA helicase of trypanosomes." PLoS One **9**(10): e109521.

- Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**: 436-42.
- Iyer, V. R., M. B. Eisen, D. T. Ross, G. Schuler, T. Moore, J. C. Lee, et al. (1999). "The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum." Science **283**(5398): 83-7.
- Kelly, S., S. Kramer, A. Schwede, P. K. Maini, K. Gull and M. Carrington (2012). "Genome organization is a major component of gene expression control in response to stress and during the cell division cycle in trypanosomes." Open Biol **2**(4): 120033.
- Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." Nucleic Acids Res **15**(20): 8125-48.
- Krieger, M. A., A. R. Avila, S. F. Ogatta, C. Plazanet-Menut and S. Goldenberg (1999). "Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **94 Suppl 1**: 165-8.
- Laub, M. T., H. H. McAdams, T. Feldblyum, C. M. Fraser and L. Shapiro (2000). "Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle." Science **290**(5499): 2144-8.
- LeBowitz, J. H., H. Q. Smith, L. Rusche and S. M. Beverley (1993). "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*." Genes & development **7**: 996-1007.
- Magarinos, M. P., S. J. Carmona, G. J. Crowther, S. A. Ralph, D. S. Roos, D. Shanmugam, et al. (2012). "TDR Targets: a chemogenomics resource for neglected diseases." Nucleic Acids Res **40**(Database issue): D1118-27.
- Martínez-Calvillo, S., J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martínez, R. G. Manning-Cela and E. E. Figueroa-Angulo (2010). "Gene Expression in Trypanosomatid Parasites." Journal of biomedicine & biotechnology **2010**: 525241.
- Martinez-Calvillo, S., S. Yan, D. Nguyen, M. Fox, K. Stuart and P. J. Myler (2003). "Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region." Mol Cell **11**(5): 1291-9.
- McKean, P. G. (2003). "Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*." Current opinion in microbiology **6**: 600-7.
- Menges, M., L. Hennig, W. Gruissem and J. A. Murray (2002). "Cell cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*." J Biol Chem **277**(44): 41987-2002.
- Minning, T. A., D. B. Weatherly, J. Atwood, 3rd, R. Orlando and R. L. Tarleton (2009). "The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*." BMC Genomics **10**: 370.
- Mittra, B. and D. S. Ray (2004). "Presence of a poly(A) binding protein and two proteins with cell cycle-dependent phosphorylation in *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding protein II." Eukaryot Cell **3**(5): 1185-97.
- Mittra, B., K. M. Sinha, J. C. Hines and D. S. Ray (2003). "Presence of multiple mRNA cycling sequence element-binding proteins in *Crithidia fasciculata*." J Biol Chem **278**(29): 26564-71.
- Molyneux, D. H. (2014). "Neglected tropical diseases: now more than just 'other diseases'--the post-2015 agenda." Int Health **6**(3): 172-80.
- Montgomery, S. P., M. C. Starr, P. T. Cantey, M. S. Edwards and S. K. Meymandi (2014). "Neglected parasitic infections in the United States: Chagas disease." Am J Trop Med Hyg **90**(5): 814-8.
- Munoz, M. J., M. I. Santori, F. Rojas, E. B. Gomez and M. T. Tellez-Inon (2006). "*Trypanosoma cruzi* Tcp12CKS1 interacts with parasite CRKs and rescues the p13SUC1 fission yeast mutant." Mol Biochem Parasitol **147**(2): 154-62.
- Murray, A. W. A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." Cell **116**: 221-234.
- Nardelli, S. C., J. P. C. da Cunha, M. C. M. Motta and S. Schenkman (2009). "Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage." Chromosoma **118**: 487-99.
- Naula, C., M. Parsons and J. C. Mottram (2005). "Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*." Biochimica et biophysica acta **1754**: 151-9.

- Nilsson, D., K. Gunasekera, J. Mani, M. Osteras, L. Farinelli, L. Baerlocher, et al. (2010). "Spliced leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*." PLoS pathogens **6**.
- Ouellette, M. and B. Papadopoulou (2009). "Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes." J Biol **8**(11): 100.
- Palenchar, J. B. and V. Bellofatto (2006). "Gene transcription in trypanosomes." Molecular and biochemical parasitology **146**: 135-41.
- Pastro, L., P. Smircich, L. Perez-Diaz, M. A. Duhagon and B. Garat (2013). "Implication of CA repeated tracts on post-transcriptional regulation in *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **134**(4): 511-8.
- Pena-Diaz, J., S. A. Hegre, E. Anderssen, P. A. Aas, R. Mjelle, G. D. Gilfillan, et al. (2013). "Transcription profiling during the cell cycle shows that a subset of Polycomb-targeted genes is upregulated during DNA replication." Nucleic Acids Res **41**(5): 2846-56.
- Peng, D., S. P. Kurup, P. Y. Yao, T. A. Minning and R. L. Tarleton (2014). "CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*." MBio **6**(1): e02097-14.
- Perez-Diaz, L., L. Pastro, P. Smircich, B. Dallagiovanna and B. Garat (2013). "Evidence for a negative feedback control mediated by the 3' untranslated region assuring the low expression level of the RNA binding protein TcRBP19 in *T. cruzi* epimastigotes." Biochem Biophys Res Commun **436**(2): 295-9.
- Perry, K. L., K. P. Watkins and N. Agabian (1987). "Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**: 8190-8194.
- Pickering, B. M. and A. E. Willis (2005). "The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease." Semin Cell Dev Biol **16**(1): 39-47.
- Ploubidou, A., D. R. Robinson, R. C. Docherty, E. O. Ogbadoyi and K. Gull (1999). "Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis." Journal of cell science **112** (Pt 2): 4641-50.
- Porcile, P. E., M. R. M. Santos, R. T. Souza, N. V. Verbisck, A. Brandão, T. Urmenyi, et al. (2003). "A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers." Gene **308**: 53-65.
- Potenza, M., S. Schenkman, M. Laverriere and M. T. Tellez-Inon (2012). "Functional characterization of TcCYC2 cyclin from *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **132**(4): 537-45.
- Recinos, R. F., L. V. Kirchhoff and J. E. Donelson (2001). "Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*." Molecular and biochemical parasitology **113**: 215-22.
- Respuela, P., M. Ferella, A. Rada-Iglesias and L. Aslund (2008). "Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*." J Biol Chem **283**(23): 15884-92.
- Rustici, G., J. Mata, K. Kivinen, P. Lio, C. J. Penkett, G. Burns, et al. (2004). "Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle." Nat Genet **36**(8): 809-17.
- Sabaj, V., L. Aslund, U. Pettersson and N. Galanti (2001). "Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*." J Cell Biochem **80**(4): 617-24.
- Santori, M. I., S. Laria, E. B. Gomez, I. Espinosa, N. Galanti and M. T. Tellez-Inon (2002). "Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **121**(2): 225-32.
- Santos, A., R. Wernersson and L. J. Jensen (2015). "Cyclebase 3.0: a multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes." Nucleic Acids Res **43**(Database issue): D1140-4.
- Sather, S. (1985). "A 5' Spliced Leader is Added in Trans to Both alpha - and -tubulin Transcripts in *Trypanosoma brucei*." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**: 5695-5699.
- Savioli, L. and D. Daumerie (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases : second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases.,, World Health Organization,.

- Siegel, T. N., D. R. Hekstra, L. E. Kemp, L. M. Figueiredo, J. E. Lowell, D. Fenyo, et al. (2009). "Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*." Genes Dev **23**(9): 1063-76.
- Simpson, L. (1973). "Structure and function of kinetoplast DNA." J Protozool **20**(1): 2-8.
- Smircich, P., G. Eastman, S. Bispo, M. A. Duhagon, E. P. Guerra-Slompo, B. Garat, et al. (2015). "Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*." BMC Genomics **16**: 443.
- Smircich, P., D. Forteza, N. M. El-Sayed and B. Garat (2013). "Genomic analysis of sequence-dependent DNA curvature in *Leishmania*." PLoS One **8**(4): e63068.
- Solari, A. J. (1995). "Mitosis and genome partition in trypanosomes." Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopía Electronica ... et. al **19**: 65-84.
- Spellman, P. T. and G. Sherlock (2004). "Reply: whole-culture synchronization - effective tools for cell cycle studies." Trends Biotechnol **22**(6): 270-3.
- Stuart, K., R. Brun, S. Croft, A. Fairlamb, R. E. Gurtler, J. McKerrow, et al. (2008). "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." J Clin Invest **118**(4): 1301-10.
- Thomas, S., A. Green, N. R. Sturm, D. A. Campbell and P. J. Myler (2009). "Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*." BMC Genomics **10**: 152.
- Toledo, M. J., M. T. Bahia, V. M. Veloso, C. M. Carneiro, G. L. Machado-Coelho, C. F. Alves, et al. (2004). "Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes." J Antimicrob Chemother **53**(6): 1045-53.
- Tyler, K. M. and D. M. Engman (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." Int J Parasitol **31**(5-6): 472-81.
- Vindry, C., L. Vo Ngoc, V. Krusys and C. Gueydan (2014). "RNA-binding protein-mediated post-transcriptional controls of gene expression: integration of molecular mechanisms at the 3' end of mRNAs?" Biochem Pharmacol **89**(4): 431-40.
- Weatherly, D. B., C. Boehlke and R. L. Tarleton (2009). "Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome." BMC genomics **10**: 255.
- Whitfield, M. L., G. Sherlock, A. J. Saldanha, J. I. Murray, C. A. Ball, K. E. Alexander, et al. (2002). "Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors." Mol Biol Cell **13**(6): 1977-2000.
- WHO. (2015). Retrieved January 2016, from http://www.who.int/neglected_diseases/en/.
- Willis, A. E. (1999). "Translational control of growth factor and proto-oncogene expression." Int J Biochem Cell Biol **31**(1): 73-86.
- Zhou, Q., H. Hu and Z. Li (2014). "New insights into the molecular mechanisms of mitosis and cytokinesis in trypanosomes." Int Rev Cell Mol Biol **308**: 127-66.