



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

# Aproximación a la genómica funcional del ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*

**Tesina de Grado  
Licenciatura en Bioquímica**

**Laboratorio de Interacciones Moleculares  
Facultad de Ciencias - Universidad de la República**

**Santiago Chávez**

Tutoría  
Dra. María Ana Duhagón



**Febrero 2012**

# ÍNDICE

<u>1   INTRODUCCIÓN</u>	2
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.1.1 Enfermedad de Chagas y ciclo de vida del parásito .....	2
1.1.2 Características particulares de la biología celular .....	7
1.1.3 Aspectos de la biología molecular .....	8
1.1.4 Aproximaciones genómicas .....	10
1.2 Ciclo Celular .....	13
1.2.1 Ciclo Celular Eucariota y su regulación .....	13
1.2.2 Ciclo celular en <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
<u>2   ESTRATEGIA</u>	19
<u>3   OBJETIVOS</u>	22
3.1 Objetivo General .....	22
3.1.1 Objetivos Específicos .....	22
<u>4   MATERIALES Y MÉTODOS</u>	23
4.1 Cultivo de parásitos <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	23
4.1.1 Medio .....	23
4.1.2 Cultivo .....	23
4.1.3 Curva de Crecimiento .....	24
4.2 Manipulación de Ácidos Nucléicos .....	24
4.2.1 Mantenimiento de la integridad del ARN .....	24
4.2.2 Extracción de ARN .....	24
4.2.3 Cuantificación de ARN .....	25
4.2.4 Electroforesis en gel de Agarosa .....	25
4.3 Sincronización de Cultivos .....	26
4.3.1 Protocolo de Sincronización .....	26
4.3.2 Análisis por Inmunofluorescencia .....	26
4.3.3 Análisis por Citometría de flujo .....	27
4.4 Aislamiento de Polisomas .....	30
4.4.1 Obtención de extractos celulares .....	30
4.4.2 Obtención de fracciones sub-celulares .....	31
<u>5   RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	32
5.1 Sincronización de Cultivos de Epimastigostas de <i>T. cruzi</i> .....	32
5.1.1 Determinación del tiempo de duplicación de los cultivos .....	32
5.1.2 Sincronización de cultivos con Hidroxiurea .....	34
5.2 Obtención de la Fracción Polisomal .....	46
5.2.1 Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas .....	47
5.2.2 Visualización del Contenido de ARN de las fracciones .....	50
<u>6   CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	55
<u>BIBLIOGRAFÍA  </u>	57
<u>AGRADECIMIENTOS  </u>	63

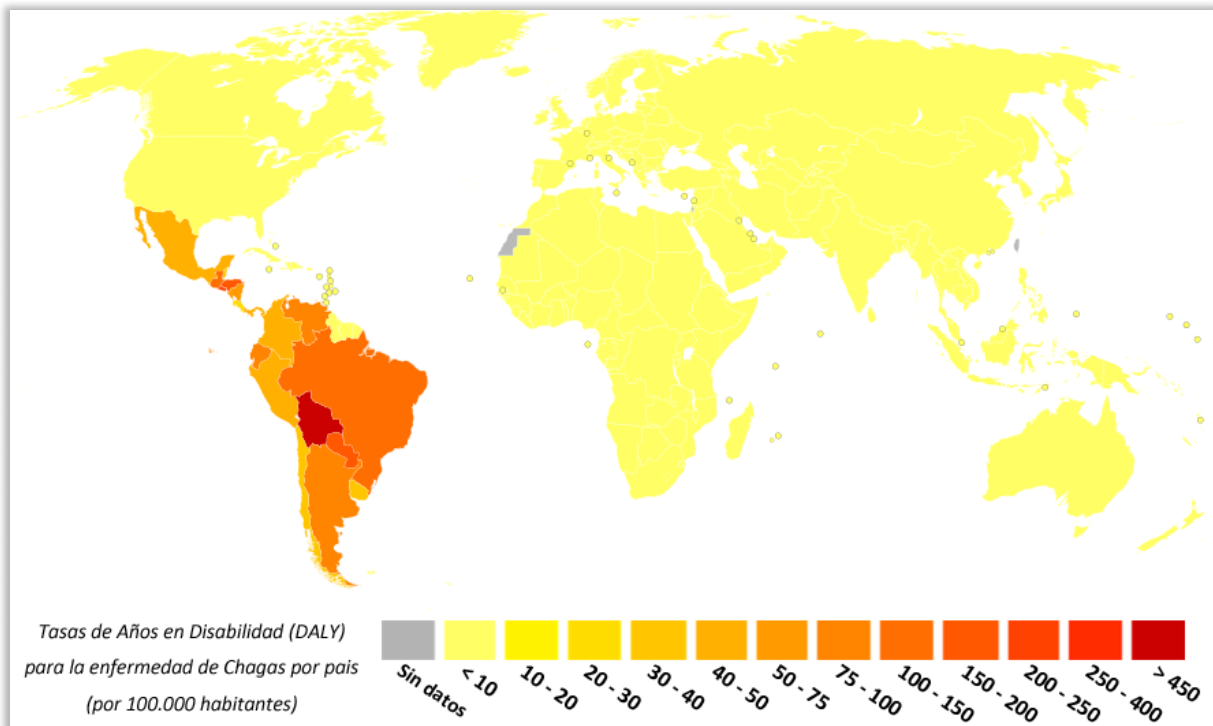
# 1 | INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Trypanosoma cruzi*

### 1.1.1 Enfermedad de Chagas y ciclo de vida del parásito

El protozooario *Trypanosoma cruzi*, pertenece a la familia Trypanosomatidae, que se compone exclusivamente de parásitos que afectan a organismos invertebrados, fundamentalmente insectos (Podlipaev 2001). En algunos géneros el ciclo de vida del parásito puede involucrar un segundo hospedero, que en la mayoría de los casos es un mamífero. Cuando estos organismos afectan a humanos se desarrollan parasitosis que han alcanzado efectos devastadores en regiones Tropicales y Sub-tropicales en todo el mundo (Guhl 2007). Entre las de mayor impacto se encuentran la tripanosomiasis americana, causada por *Trypanosoma cruzi*; la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, causada por *Trypanosoma brucei*; y varios tipos de leishmaniasis, que son causadas por diferentes especies del género *Leishmania sp.* (Stuart et al. 2008).

La Tripanosomiasis americana, popularmente conocida como Enfermedad de Chagas (Chagas 1909), se encuentra difundida principalmente en regiones rurales tropicales y subtropicales de América Latina, en donde se estiman entre 16 a 18 millones de individuos infectados y aproximadamente 120 millones en riesgo de infección (Guhl 2007). Esta parasitosis comprende una zoonosis muy compleja. En primer lugar, existe una gran variedad de cepas de *T. cruzi* que son capaces de infectar diversas especies pertenecientes a 24 familias diferentes de animales, tanto domésticos como silvestres, que actúan como reservorios naturales del parásito (Guhl 2007). A la vez, involucra un gran número de vectores, insectos hematófagos pertenecientes a la subfamilia *Triatominae*, que intervienen en la transmisión de la enfermedad a nuevos individuos. En suma, esto lleva a pensar que las estrategias de erradicación del parásito serían poco efectivas y por lo tanto esta parasitosis continua representando una grave amenaza para la salud de los países en regiones endémicas **Figura 1.1** (Guhl 2007).



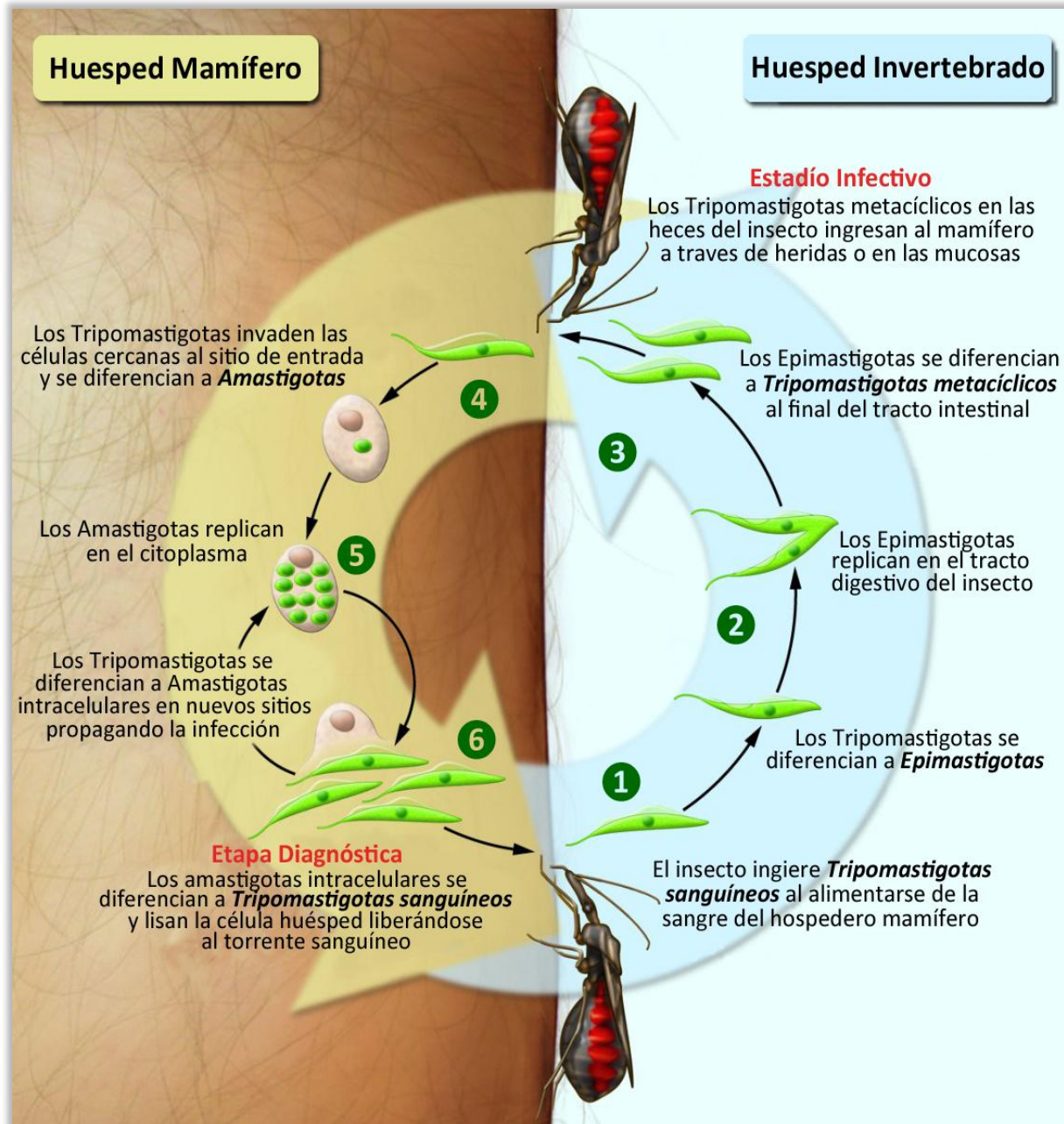
**Figura 1.1** Regiones endémicas para la Enfermedad de Chagas. Esquema realizado a partir de datos de morbi-mortalidad de la OMS (World Health Organization, 2004). El parámetro estadístico DALY (del inglés *Disability-Adjusted Life Year*) representa el número de años perdidos (respecto a la esperanza de vida de cada país) debido a la mala salud, discapacidad o muerte prematura. Este parámetro refleja aspectos de morbilidad y mortalidad de una enfermedad en una única medida. La imagen fue elaborada en base a los resultados del informe de WHO del año 2004 (World Health Organization, 2004) y está alojada en el servidor [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chagas\\_disease\\_world\\_map\\_-\\_DALY\\_-\\_WHO2004.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chagas_disease_world_map_-_DALY_-_WHO2004.svg)

La sintomatología y la prognosis de la enfermedad de Chagas son muy variables y dependen de múltiples factores, como la carga parasitaria al momento de la infección y la situación inmunitaria del hospedero (Coura et al. 2010). La enfermedad se manifiesta en 2 etapas: una etapa aguda, que se da inmediatamente después de la infección; y una etapa crónica, que se desarrolla a lo largo de los años. La etapa aguda está caracterizada por una alta parasitemia y síntomas de intensidad variable que incluyen fiebre, fatiga, dolores corporales, vómitos y diarrea. Estos síntomas generalmente son evidentes en niños menores de 10 años, mientras que en adultos la etapa aguda suele presentarse asintómicamente (Coura et al. 2010). El único marcador clínico clásico de esta etapa se conoce como signo de Ramaña o Chagoma que consiste la aparición de un nódulo, usualmente cercano a los ojos o la hinchazón de un párpado, lo que representa el sitio de entrada de los parásitos. En un período de entre 4 a 12 semanas la mayor parte de los casos agudos se resuelven y dan lugar a la etapa crónica de la enfermedad. Entre un 60-

80% de los individuos permanecen con una infección latente, que por lo general se aloja en células musculares, en lo que se conoce como un estado indeterminado de la etapa crónica, en el cual no se desarrolla ningún tipo de síntomas. El restante 20-40% desarrolla una etapa crónica sintomática, en la cual se ven afectados el sistema nervioso, el digestivo y el muscular. Estos casos generalmente progresan hacia el desarrollo de graves cardiopatías y megaformaciones digestivas que amenazan la vida del individuo afectado (Coura et al. 2010).

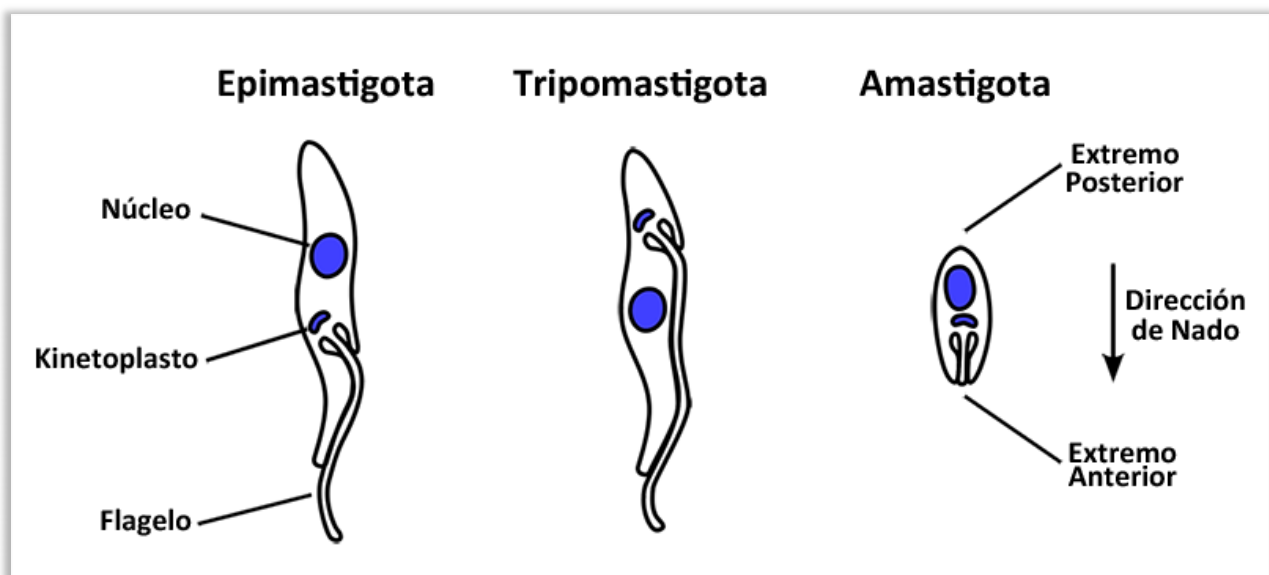
En lo que se refiere al tratamiento actual de la enfermedad, las drogas disponibles no sólo no son efectivas para la eliminación del parásito, sino que son altamente tóxicas para el huésped (Guhl 2007). Hasta el momento, son dos los fármacos que se utilizan para tratar la Enfermedad de Chagas: el Nifurtimox (Lampit, Bayer HealthCare); y el Benznidazol (Rochagan, Roche Pharmaceuticals). Estas drogas presentan severos efectos secundarios debido a que no actúan de forma específica sobre el parásito (Urbina 2010). A modo de ejemplo, el Benznidazol se recomienda para el tratamiento de la infección aguda, donde ha demostrado una efectividad del 71,5% en casos tratados dentro los primeros 4 meses, y también se prescribe para tratar casos de infección congénita, en este caso con un 97,9% de efectividad luego de tratamiento que se desarrolla durante los primeros 6 meses de vida (Guedes et al. 2011) Sin embargo, ninguno de los dos fármacos muestra efectividad en el tratamiento de la forma crónica de la enfermedad (5,9% para el Benznidazol), la cual es la presentación más frecuente de la enfermedad (Urbina 2010; Guedes et al. 2011).

*Trypanosoma cruzi* exhibe un ciclo de vida complejo que se desarrolla en el hospedero mamífero y en un insecto triatomínido (**Figura 1.2**), donde las especies más representativas pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*. Durante su ciclo de vida el parásito transita por cuatro estadios metabólica y morfológicamente diferentes, relacionados a los distintos ambientes donde se desarrollan (Tyler et al. 2001). Entre estos, dos son replicativos y no-infectivos: los Amastigotas en el humano y los Epimastigotas en el insecto; y los otros dos son Tripomastigotas infectivos no-replicativos. En el insecto aparecen los Tripomastigotas metacíclicos y en el huésped mamífero los Tripomastigotas sanguíneos, morfológicamente similares pero con grandes diferencias a nivel de expresión génica (Goldenberg et al. 2011).



**Figura 1.2** Esquema del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. ① Se inicia el ciclo cuando el insecto ingiere parásitos al alimentarse de la sangre de un individuo infectado. Estos parásitos se encuentran en el estadio **Tripomastigota** sanguíneo, no replicativo. ② Al avanzar por el tracto digestivo los tripomastigotas se diferencian a **Epimastigotas**, que proliferan en el tracto medio del intestino. ③ Cuando los Epimastigotas alcanzan la ampolla rectal estos son estimulados a diferenciarse a **Tripomastigotas metacíclicos**. Estos Tripomastigotas son depositados con las heces del insecto e ingresan al nuevo individuo a través de heridas, como la picadura del insecto, o a través de superficies mucosas. ④ Los tripomastigotas ingresan al citoplasma de células 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 estos son liberados al torrente sanguíneo. En el sistema circulatorio los tripomastigotas colonizan nuevas tejidos logrando una infección a nivel sistémico. El ciclo se cierra cuando nuevamente un insecto ingiere estos tripomastigotas al alimentarse con la sangre del huésped mamífero. Imagen tomada y modificada de **Stuart et al.** "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases" *J. Clin. Invest.* **118**:1301–1310 (2008).

En breve, el ciclo de vida se puede iniciar cuando el insecto se alimenta de un individuo infectado, del cual ingiere los *Tripomastigostas* sanguíneos. Al alcanzar el estomago del insecto se diferencia al estadio *Epimastigota* que prolifera rápidamente a medida que avanza por el tracto digestivo medio. Los *Epimastigotas* se acumulan en la ampolla rectal donde, por privación de nutrientes, se ve estimulada la diferenciación a *Tripomastigostas* metacíclicos no proliferativos en un fenómeno conocido como *Metaciclogénesis* (Ávila et al. 2003). Los *Tripomastigostas* expulsados en las heces del insecto son capaces de ingresar al huésped humano a través de heridas abiertas, como la picadura del insecto, o a través de superficies mucosas. A partir del sitio de entrada los *Tripomastigostas* son capaces de invadir células cercanas, y al ingresar al citosol de las mismas se desencadena la diferenciación a *Amastigotas*, denominada *amastigogénesis*. En este estadio intracelular los parásitos pierden el flagelo y pasan a una morfología más bien esférica, comparada a la forma polarizada de los *Epimastigotas* y *Tripomastigostas* (**Figura 1.3**). Por último, los *Amastigotas* recuperan la capacidad de proliferar activamente y luego



**Figura 1.3** Morfologías de los diferentes estadios del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Se pueden apreciar representaciones esquemáticas de los estadios *Epimastigota*, *Tripomastigota* y *Amastigota* que componen el ciclo de vida del parásito. La figura fue tomada y modificada de la página de libre acceso disponible en el enlace [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:TrypanosomatidMorphologies\\_PlainSVG.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:TrypanosomatidMorphologies_PlainSVG.svg)

se diferencian a *Tripomastigostas* sanguíneos que terminan desencadenando la lisis de la célula huésped. Al liberarse al torrente sanguíneo los *Tripomastigostas* pueden invadir

nuevos tejidos y de esta forma propagar la infección, o bien ser ingeridos por el insecto hematófago y de esta forma cerrar el ciclo de vida.

### 1.1.2 Características particulares de la biología celular.

Los tripanosomátidos son un grupo de protozoarios unicelulares flagelados que forman parte del Orden *Kinetoplastida*, Género *Trypanosomatidae*. Estos organismos se caracterizan por la presencia de una única gran mitocondria que contiene hasta el 25% del ADN celular (De Souza 2002). El genoma mitocondrial forma un complejo entramado de fibras de ADN circulares que se concatenan y se observa como un disco ligeramente cóncavo electrón-denso a microscopía electrónica, que se conoce como kinetoplasto, el cual consta de dos tipos de ADN circulares que se denominan maxicírculos y minicírculos (De Souza 2002). Los transcriptos codificados por el genoma mitocondrial requieren de una maduración muy particular que involucra la adición y eliminación de residuos de uridina en un proceso conocido como edición del mensajero o “editing” (Shaw et al. 1988).

Varios aspectos en relación a la estructura del flagelo comprenden particularidades de este grupo de organismos. A modo de ejemplo, el flagelo emerge de una invaginación altamente especializada en la membrana celular conocida como bolsillo flagelar donde tienen lugar una intensa actividad endocítica y exocítica. Este bolsillo está en contacto directo con el cuerpo basal del flagelo y en conjunto este complejo estructural está íntimamente asociado a la mitocondria, demostrando una clara relación estructura-función, que es de vital importancia para el parásito (**Figura 1.3**). Estos organismos cuentan con un citoesqueleto complejo, donde se destaca la formación de una estructura muy particular de microtúbulos denominados microtúbulos sub-peliculares (De Souza 2002). Estas fibras se organizan a lo largo del eje longitudinal de la célula asociados muy fuertemente a la membrana celular, y en conjunto con el flagelo son fundamentales para la movilidad del parásito.

La mitosis constituye otro proceso peculiar de estos organismos. A modo de ejemplo, la envoltura nuclear no se desensambla durante la división celular y por lo



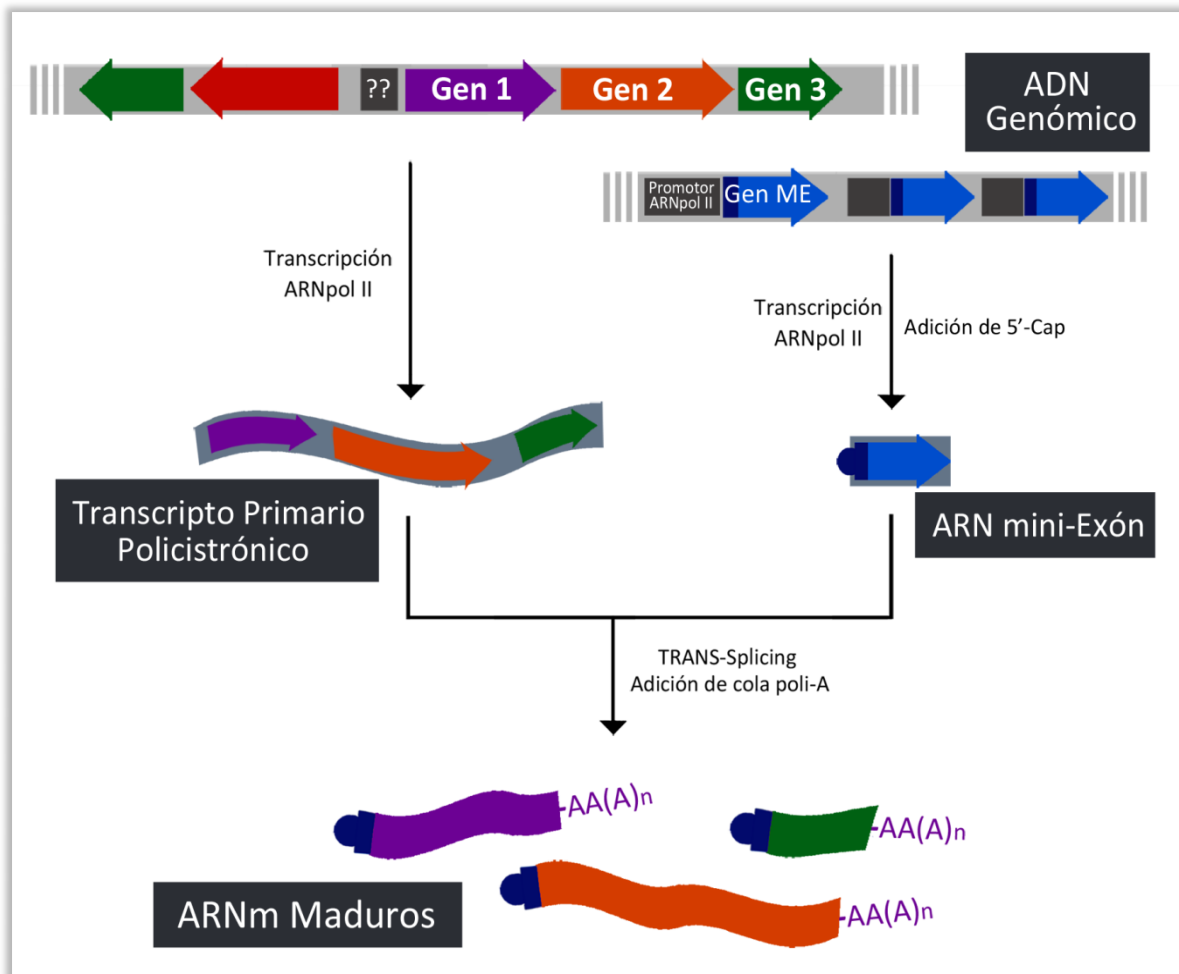
tanto el huso mitótico se forma dentro del núcleo para llevar a cabo la segregación de los cromosomas. Además, el material hereditario no se condensa hasta el nivel de los cromosomas metafásicos típicos de eucariotas superiores, sin embargo se visualizan cambios estructurales en la organización la cromatina a medida que transcurre la mitosis (Solari 1995).

### 1.1.3 Aspectos de la biología molecular

El parásito se debe adaptar a proliferar en ambientes muy diferentes al alternar de hospedero. Esto implica soportar fluctuaciones en el pH del medio, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, e incluso evadir los mecanismos de defensa del hospedero. Tal vez por este motivo, en estos organismos se observan particularidades a nivel de la expresión de sus genes, que divergen de los mecanismos observados en eucariotas superiores (**Figura 1.4**) y que probablemente responden a la necesidad de proporcionar rápidas respuestas de adaptación (Clayton 2002; Martínez-Calvillo et al. 2010).

El genoma de *T. cruzi* está organizado en grandes agregados o “clusters” direccionales de genes codificantes de proteínas, los cuales, a diferencia de los operones de procariontes, no están compuestos por genes funcionalmente relacionados entre sí (Palenchar et al. 2006). Estos clusters son sustrato de la ARN polimerasa II, la cual da lugar a grandes transcriptos policistrónicos que luego deben ser procesados a ARNm monocistrónicos maduros para poder ser traducidos. El procesamiento de estos mensajeros implica la adición de un ARN líder (ARN SL, del inglés *Splice Leader*) o Mini-Exón en el extremo 5' cada futuro ARNm maduro mediante Trans-Splicing, es decir, un evento de corte y empalme que involucra 2 moléculas diferentes de ARN, el cual fue descrito por primera vez en estos organismos (Sather 1985; Agabian 1990). Este ARN líder aporta la caperuza 5' del mensajero maduro, que también posee una estructura muy particular, conteniendo nucleótidos modificados, y se conoce como “cap-4” (Bangs et al. 1992; Perry 1987). Los genes del ARN líder forman grandes clusters de repetidos en tándem a lo largo del genoma, cada copia posee su promotor individual para la ARN polimerasa II (Gilinger et al. 2001) y da lugar a un transcripto precursor de 140 nt que luego del proceso de splicing resulta en alrededor de 39 bases en el 5' UTR del ARNm maduro (De Lange et al. 1984).

Dicho fenómeno de trans-splicing está acoplado a la poli-adenilación del extremo 3' del transcripto codificante adyacente previo en el policistrón (LeBowitz et al. 1993). De esta forma se obtienen como producto los diferentes ARNm maduros individuales, las generalidades de este proceso se pueden apreciar en el esquema presentado en la **Figura 1.4**.



**Figura 1.4** Expresión génica en *Trypanosoma cruzi*. Este esquema ilustra el proceso de transcripción policistrónica de grupos de genes no funcionalmente relacionados que ocurre en *T. cruzi*. Este fenómeno se da en ausencia de promotores canónicos para la ARN polimerasa II. Por otro lado se aprecia el procesamiento de este policistrón mediante TRANS-splicing, el cual está íntimamente vinculado a la poli-adenilación de estos mensajeros.

Más aún, considerando que la transcripción se da de forma constitutiva en todo el genoma, existen evidencias de que genes que componen un mismo policistrón pueden mostrar patrones diferentes de expresión en un momento dado, o incluso para diferentes situaciones, como ser los distintos estadios del ciclo de vida (Krieger et al.

1999; Ávila et al. 2003). Por lo cual, dada la escasa capacidad de regulación a nivel del inicio de la transcripción, se plantea que los mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional deben tomar un mayor nivel de significancia en estos organismos. En particular, las regiones transcritas no traducidas (UTRs, del inglés *Untranslated Regions*) que flanquean las regiones codificantes de los genes son sitios claves para la modulación de la abundancia de los mensajeros (Vanhamme et al. 1995). Esto está apoyado por el reconocimiento de un gran familia proteínas capaces de interactuar con los mensajeros e interferir en la expresión de los mismos, denominadas en conjunto TcRBP (del inglés, *T. cruzi* RNA-binding protein) (De Gaudenzi et al. 2003). Nuevamente, en compensación a la escasa regulación a nivel transcripcional se supone que debe existir un mayor control de la expresión de los genes a nivel de la estabilidad de sus ARNm. Para *T. cruzi*, varios trabajos muestran la importancia de la movilización de ARNm a los polisomas (Ávila et al. 2003; Gentil et al. 2009; Nardelli et al. 2007), evidenciando así la importancia de la modulación de la expresión génica a nivel de la traductibilidad de los ARNm. Es así que los tripanosomátidos son utilizados como organismo modelo para el estudio de la regulación génica a nivel post-transcripcional, sobre todo los mecanismos que actúan sobre los procesos de maduración, estabilidad y traducción de los ARN mensajeros modificando los patrones de expresión de los diferentes genes.

#### 1.1.4 Aproximaciones genómicas

Varios de los avances en la biología de estos organismos en los últimos años se deben en gran parte a la disponibilidad de las secuencias genómicas de los tres principales tripanosomátidos patógenos de humanos. Las secuencias genómicas correspondientes a *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major* (en conjunto denominados Tritryps) fueron publicadas en el 2005 junto con un artículo de genómica comparativa de los tres organismos (El-Sayed et al. 2005a; Berriman et al. 2005; Ivens et al. 2005; El-Sayed et al. 2005b). En particular, el trabajo en *T. cruzi* reveló la naturaleza diploide de su genoma, el cual se estimó que comprende aproximadamente 110 Mpb, en los cuales inicialmente se identificaron 22.750 marcos abiertos de lectura y para más de la mitad de los mismos no se pudo asignar ningún tipo de función basada en homología a proteínas

conocidas. Este genoma demostró presentar un alto contenido de secuencias repetidas, alcanzando hasta un 50% del mismo, lo cual en conjunto con el hecho de que la cepa elegida (CL-Brener TcIV) constaba con un genoma diploide híbrido, llevó a que el proceso de ensamblaje de las secuencias obtenidas fuera extremadamente dificultoso. A medida que se trabajaba en este proceso se pasó a secuenciar con una baja cobertura un clon de la cepa Esmeraldo, el cual permitió distinguir los 2 haplotipos presentes en la cepa CL Brener y clasificarlos en linajes Esmeraldo y No-Esmerlado (El-Sayed et al. 2005a). Hoy en día el ensamblaje de las secuencias genómicas todavía no ha sido resuelto en su totalidad, a pesar de que han existido avances muy importantes en el tema. A modo de ejemplo, posteriormente se logró asociar la gran mayoría de las secuencias a los 41 pares de cromosomas homólogos (Weatherly et al. 2009). Estos resultados son acordes a lo cantidad de cromosomas estimada previamente en experimentos de electroforesis en gel de campo pulsado (Branche et al. 2006; Porcile et al. 2003). Por otro lado, todavía queda mucho trabajo por hacer respecto a la funcionalidad de estos genomas. En este sentido una revisión reciente señala que entre un 60-70% de los genes predichos como codificantes de proteínas para los *Trityps* permanecen sin anotar, y gran parte de estos pertenecen a *T. cruzi* (Choi et al. 2011).

A partir de la disponibilidad de este material los avances en el campo de la genómica han empezado a desarrollarse con más velocidad, en conjunto con la implementación de las nuevas tecnologías de secuenciación profunda y al desarrollo de recursos especializados como la base de datos en línea TritrypDB disponible en el servidor <http://tritrypdb.org/tritrypdb/> (Aslett et al. 2010).

Con respecto a análisis de genómica funcional en los *Trityps*, ha sido mayor el avance en la implementación de estas aproximaciones para los otros tripanosomátidos que para *T. cruzi*. Por ejemplo, para *T. brucei* en los últimos años se han llevado cabo varios análisis de expresión génica global, basados en la determinación de los niveles de ARNm. En primer lugar, utilizando tecnologías de microarreglos se analizaron los patrones globales de abundancia de mensajeros para los procesos de diferenciación (Kabani et al. 2009; Jensen et al. 2009). Luego se comenzaron a implementar las tecnologías de secuenciación de próxima generación o de secuenciado profundo, en lo que se conoce como estudios de transcriptómica por RNA-seq (del inglés, *RNA sequencing*) (Wang et al. 2009). A partir del

uso de estas tecnologías se publicó el primer transcriptoma con resolución a nivel del nucleótido simple para *T. brucei* (Kolev et al. 2010), estudio que aportó datos muy importantes respecto a la secuencia de los 5' y 3' UTRs y respecto a validar la existencia de sitios de inicio de la transcripción internos a los policistrones. Ese mismo año, otro grupo de investigación publica el análisis de los transcriptomas para dos estadios del ciclo de vida de *T. brucei*, también mediante RNA-seq (Siegel et al. 2010).

En lo que se refiere a *T. cruzi*, hoy en día existe un único estudio de genómica funcional, el cual comprende un análisis de transcriptómica a lo largo del ciclo de vida del parásito (Minning et al. 2009). A pesar de que las conclusiones de este trabajo son limitadas, debido tanto a la plataforma (microarreglos de ADN), como a la metodología utilizada (abarca solo transcriptoma el estado estacionario), se observó que los niveles de ARNm de por lo menos un 50% de los genes de *T. cruzi* están regulados a lo largo del ciclo de vida. El único trabajo a la fecha en donde se utiliza una metodología de secuenciado profundo en *T. cruzi* consiste en un estudio de la población de ARNs de pequeño tamaño, lo que los autores denominaron el transcriptoma de secuencias cortas no codificantes (Franzén et al. 2011). Este trabajo se enfocó en este grupo de moléculas pequeñas, emergentes en aspectos de regulación de la expresión génica en eucariotas superiores, que todavía no habían sido abordadas en *T. cruzi*. A pesar de que se confirma la ausencia de la vía clásica de interferencia por ARNs (RNAi) en *T. cruzi* (Ullu et al. 2004), debido a la abundancia de varios tipos de estos ARNs no se descarta la posibilidad de que los mismos sean funcionales interviniendo probablemente en mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional.

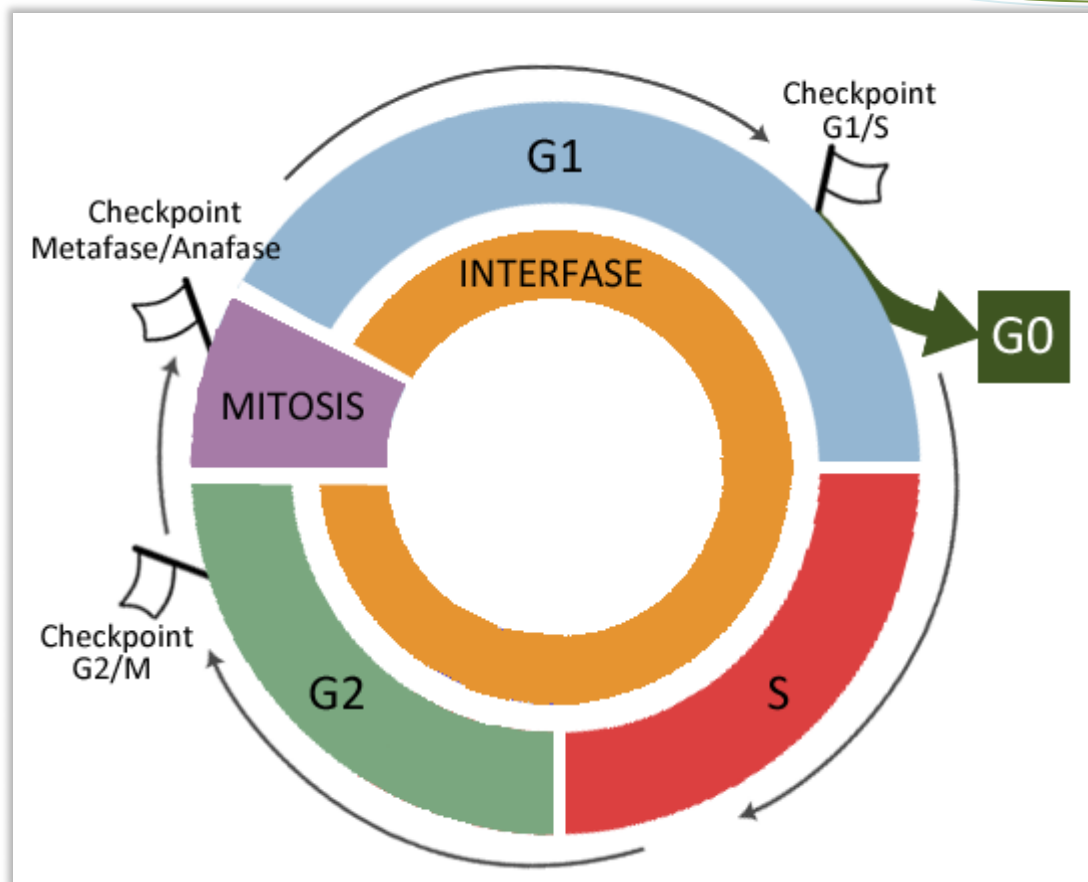
Finalmente, la regulación de la expresión génica global a nivel de la traductibilidad de los ARNm aún no ha sido abordada en *T. cruzi*. El proyecto en que se enmarca esta Tesina busca investigar esta temática por primera vez, a través del análisis de los ARNm que están asociados a ribosomas, y que por ende están siendo activamente transcritos. Más aún, intenta analizar los perfiles de huellas polisomales (ver sección 2), de modo de obtener una aproximación a las tasas de traducción de los ARNm. Esperamos que los resultados obtenidos permitan una mejor comprensión de la importancia de la traductibilidad de los ARNm en la regulación génica post-transcripcional en estos organismos.

## 1.2 Ciclo Celular

### 1.2.1 Ciclo Celular Eucariota y su regulación

El ciclo celular es la secuencia coordinada de eventos que permite la correcta división de la célula. Históricamente el ciclo celular se dividía en dos etapas: una mayor duración conocida como Interfase, descrita por microscopistas del siglo XX como inactiva; y una segunda etapa, descrita como activa, dado que observaba la segregación de los cromosomas, conocida como Mitosis. La Interfase consiste en 2 períodos de crecimiento celular que poseen un metabolismo muy activo, las fases G1 y G2 (del inglés *gap*, brecha o intervalo), que están interrumpidos por una etapa de duplicación del material genético, conocida como fase S (fase de Síntesis) (**Figura 1.5**). En la mitosis se lleva a cabo la correcta segregación de los componentes celulares a lo que después serán las dos células hijas. Por último, en una etapa que se conoce como Citocinesis, se da la división de la célula en paralelo con las últimas etapas de la mitosis. En el principio de la fase G1 las células pueden optar, en respuesta a diferentes señales extracelulares, por entrar en un estado de quiescencia conocido como G0 (**Figura 1.5**), saliendo del ciclo replicativo (Schafer 1998).

Para la progresión del ciclo celular es necesaria una maquinaria de control que regule las transiciones entre los eventos, es decir, que asegure que los mismos sucedan en el orden correcto y una única vez por ciclo. Existen tres puntos de control (en inglés: *Chekpoints*) relativamente conservados entre eucariotas, en donde el ciclo se puede detener si no se cumplen las condiciones necesarias para llevar adelante los procesos que continúan.



**Figura 1.5** Representación esquemática del ciclo celular Eucariota. Se pueden apreciar las diferentes fases que componen al ciclo celular así como los tres puntos de control.

Al final de la Fase G1 se encuentra el primer tres puntos de control, que verifica que las condiciones sean óptimas previo al ingreso a Fase S, pudiéndose tomar la decisión de demorar la división o incluso entrar al estado G0. Este punto de control chequea la disponibilidad de nutrientes, especialmente aquellos necesarios para la replicación del material genético y de la cromatina. El segundo punto de control se encuentra al final de la etapa G2 y regula la entrada a Mitosis. En esta instancia se verifica, además de condiciones ambientales favorables, la correcta duplicación de la totalidad del material hereditario. A modo de ejemplo, señales de daño al ADN inhiben la entrada a Mitosis, es decir, el pasaje del *checkpoint* G2/M. Por último, el tercer tres puntos de control es interno a la Mitosis, controla la entrada en anafase. Es en este punto que se verifica que todos los cromosomas estén correctamente alineados en la placa metafásica, asegurando así la correcta segregación del material hereditario (**Figura 1.5**).

La maquinaria molecular que gobierna la progresión de estos procesos es compleja y está compuesta por muchas proteínas que llevan a cabo sus funciones mediante diversos mecanismos. Varios estudios sobre organismos modelo, señalan la importancia de mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional y post-traduccionales de las moléculas reguladoras del ciclo celular. Eventos como la activación/inhibición de factores mediante fosforilación/defosforilación y la proteólisis mediada por ubiquitinación juegan roles muy importantes en estas vías de señalización (Le Breton et al. 2005; Schafer 1998; Bybee et al. 1991). Ciclinas y CDKs (quinasas dependientes de ciclinas, del inglés) representan las dos clases de moléculas reguladoras más importantes para el avance del ciclo, actuando en conjunto para desencadenar importantes cascadas de señalización vinculadas a la resolución de los diferentes puntos de control (Bybee et al. 1991). Las CDKs se mantienen en altos niveles en la célula a lo largo del ciclo dado que su actividad catalítica es regulada a nivel post-traduccionales, principalmente por la asociación a ciclinas y la fosforilación de ciertos aminoácidos conservados (Morgan 1995; Pines 1995). Por otro lado, las ciclinas fueron descritas originalmente como proteínas cuyos niveles celulares oscilaban a lo largo del ciclo, pero actualmente se requiere un alto nivel de homología en el dominio conservado llamado “cyclin-box” e interacción demostrada con algún tipo de CDK (Andrews et al. 1998). La expresión génica de las ciclinas a lo largo del ciclo, así como la expresión de muchas otras moléculas de control, está altamente regulada a nivel transcripcional, mientras que las CDKs se transcriben a un nivel relativamente constante a lo largo del ciclo (Murray 2004; McKinney et al. 1991; Rustici et al. 2004).

### 1.2.2 Ciclo celular en *Trypanosoma cruzi*

Los tripanosomátidos cuentan con características particulares que probablemente incrementen la complejidad del ciclo de división celular en comparación al de los eucariotas multicelulares. En primer lugar, se enfrentan con la dificultad de dividir una célula altamente polarizada con una arquitectura celular compleja. Por otro lado, poseen varios organelos únicos por célula que deben duplicarse y segregarse correctamente, como son la mitocondria, el flagelo y el núcleo. Esto lleva a que la división celular en estos organismos requiera de una serie de eventos finamente coordinados tanto temporalmente



como espacialmente (McKean 2003). El núcleo y la mitocondria, los dos organelos que contienen material genético en estos organismos replican su ADN y se dividen de forma desfasada; más específicamente, la mitosis nuclear se da solamente después que se completa la segregación del kinetoplasto (Elias et al. 2007). Experimentos en *T. brucei* donde se interfiere con eventos del ciclo mediante el uso de diferentes drogas han mostrado resultados que sugieren la presencia de puntos de control del ciclo alternativos a los observados en células de eucariotas superiores.

Asimismo, el parásito se ve obligado a alternar entre formas replicativas y quiescentes a lo largo de su ciclo de vida. La integración necesaria para coordinar estas transiciones con la progresión del ciclo celular nuevamente demuestra un alto grado de complejidad en los mecanismos de control (Ávila et al. 2003; Krieger et al. 1999). En *T. cruzi* las etapas del ciclo y los principales eventos que ocurren a nivel celular han sido estudiados para la forma epimastigota del parásito, mientras que es muy poco lo que se conoce para el estadio amastigota intracelular (Elias et al. 2007).

Los mecanismos de regulación del ciclo celular a nivel molecular todavía son poco entendidos en estos organismos. Sin embargo varios trabajos apuntan a que existe una divergencia importante con los mecanismos observados en eucariotas superiores. El clonado de 2 proteínas de *T. cruzi*, denominadas CRK-1 y CRK-3 (del inglés, *Cdc-2 Related Kinases*) y la observación de actividad quinasa dependiente de la asociación con ciclinas de mamíferos constituyó la primer evidencia de la existencia de CDKs en este organismo (Gómez et al. 1998). Este trabajo continuó con la caracterización de estas dos CRKs y la identificación de tres posibles ciclinas por ensayos de doble híbrido en levadura, dos de las cuales interactúan con CRK-3 (Gómez et al. 2001). Finalmente, la participación de estas proteínas en el ciclo fue demostrada mediante experimentos de sincronización de cultivos, en los cuales se pudo verificar diferente actividad catalítica de CRK-3 a lo largo del ciclo (Santori et al. 2002). Por otro lado, se han realizado importantes avances en el entendimiento del rol que juegan las histonas en ciclo de *T. cruzi* gracias al aporte de un grupo de investigación de Brasil dirigido por el Dr. Schenkman. En primer lugar, ellos demostraron que la histona H1 es fosforilada en un sitio típico de CDKs y que el estado de fosforilación de esta proteína tiene una correlación con el ciclo celular (Marques Porto et al. 2002; da Cunha et al. 2005). Más aún, se pudo constatar que la localización nuclear de

esta histona H1 varía a lo largo del ciclo, observándose una concentración a nivel del nucléolo en primer instancia, que luego, al ser fosforilada, se dispersa hacia el resto del núcleo mientras la célula avanza hacia la mitosis (Gutiyama et al. 2008). También se pudo constatar varias modificaciones post-traduccionales presentes en la histona H4 que están relacionadas al avance del ciclo, así como a respuestas frente al daño al ADN y al proceso de diferenciación del parásito (da Cunha et al. 2006; Nardelli et al. 2009). De hecho, los únicos trabajos que estudian la expresión de genes individuales durante el ciclo celular de *T. cruzi* analizan los perfiles de expresión para los genes de las histonas (Recinos et al. 2001; Sabaj et al. 2001).

Se ha avanzado más en el entendimiento de los mecanismos de control del ciclo celular en el parásito *Trypanosoma brucei* (Hammarton et al. 2003a; Hammarton 2007). A pesar de que es probable que varios aspectos sean compartidos con *T. cruzi*, también existen grandes diferencias entre los mismos que apuntarían más bien hacia un control del ciclo celular con particularidades específicas de cada especie. A modo de ejemplo, la forma replicativa de *T. brucei* en el huésped mamífero es extracelular y tiene una morfología de tipo “epimastigota”, a diferencia de las amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Hasta el momento no existen estudios acerca de la expresión génica global de *T. cruzi* a lo largo del ciclo celular, a pesar de que recientemente el grupo de trabajo de Christine Clayton en Alemania publicó el transcriptoma en estado estacionario de las etapas del ciclo celular de *Trypanosoma brucei* mediante secuenciación profunda (Archer et al. 2011). A partir del análisis de los perfiles de expresión obtenidos en este trabajo se reveló que por lo menos 430 genes son diferencialmente expresados para alguna de las etapas del ciclo celular, aunque solo una minoría de estos presenta homología con reguladores conocidos del ciclo en eucariotas superiores. Por otro lado, a partir de análisis bioinformáticos se encontraron motivos de secuencia en los ARNm que demostraron estar sobre representados en genes co-regulados en el ciclo celular y conservados dentro de los kinetoplastos. Un trabajo previo de este mismo grupo de investigadores había demostrado que existe regulación de la proteína de unión al ARN PUF9 a lo largo del ciclo y que la interferencia por RNAi de la misma causaba una acumulación de células en la fase G2/M (Archer et al. 2009). Esto refuerza la importancia de los mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional en la regulación del ciclo celular en los tripanosomátidos.

Los mecanismos que gobiernan la progresión del ciclo celular determinan la proliferación y diferenciación del parásito, y es así que las drogas dirigidas a componentes del ciclo celular constituyen excelentes candidatos a terapias efectivas para detener el avance de las enfermedades que causan estos organismos. Dada la amplia divergencia existente entre los mecanismos reguladores del ciclo en los tripanosomátidos y los del huésped humano, la terapia dirigida a este proceso probablemente resulte más específica que las existentes al momento. Estos dos aspectos combinados llevan a que el ciclo celular de los protozoarios patógenos haya sido propuesto por varios autores como una fuente importante de blancos para el desarrollo de nuevas terapias antiparasitarias (Hammarton et al. 2003b; Grant 2008; Naula et al. 2005).

## 2 | ESTRATEGIA

Este trabajo de tesina comprende los primeros pasos de un proyecto de mayor alcance que plantea avanzar en el estudio de los mecanismos moleculares que controlan el ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*, utilizando herramientas de genómica y aproximaciones bioinformáticas. En particular, se plantea determinar perfiles de expresión génica para cada una de las etapas del ciclo celular de *T. cruzi*.

Como ya se discutió, la regulación de la expresión génica se da principalmente a nivel post-transcripcional en este organismo. Esto lleva a preguntarse cómo se ejerce la regulación en torno a los puntos de control del ciclo, que es tan dependiente del inicio de la transcripción en los organismos eucariotas estudiados. La metodología planteada es especialmente apropiada para abordar esta pregunta dado que pretende incorporar el estudio de la regulación de la expresión génica a nivel post transcripcional, estudiando la movilización polisomal, que podría de algún modo reemplazar el control transcripcional clásicamente observado en otros organismos. Es así que se plantea analizar no solamente la abundancia de los ARNm totales, como se ha hecho tradicionalmente, sino también analizar el subconjunto de ARNm que se está traduciendo activamente en poliribosomas y determinar en qué tasa lo hacen. Para esto estudiaremos el perfil de huellas polisomales o “ribosomal footprinting”, una aproximación genómica innovadora desarrollada por el grupo de Ingolia y colaboradores (Ingolia et al. 2009). Esta estrategia de análisis, aún poco utilizada, se basa en el registro de la presencia de los ribosomas sobre los mensajeros que se están traduciendo, mediante secuenciación profunda. Con este objetivo, en primer lugar, se obtiene la fracción de mensajeros asociada a polisomas mediante centrifugación diferencial. Luego, se realiza una digestión enzimática de los ARNm asociados a ribosomas, de la cual se obtienen fragmentos de aproximadamente 28nt (denominados huellas polisomales) que resultan ser protegidos por el ribosoma en la digestión. Estos fragmentos de 28nt se secuencian mediante secuenciación masiva, para luego mapearse sobre los mensajeros correspondientes a nivel bioinformático. A partir del análisis de estos perfiles se pueden inferir las tasas de traducción de cada mensajero, y en conjunto con las cantidades relativas de ARNm (transcriptoma en estado estacionario) se puede estimar los

niveles de síntesis de proteínas de forma masiva para las diferentes etapas del ciclo celular de *T. cruzi*.

De este modo, esta estrategia proporciona información de tipo “proteómica” en el sentido de que es capaz de develar los genes están siendo traducidos a su producto final proteico y con qué tasa. Por lo tanto, provee información global y cuantitativa de los perfiles prospectivos de expresión proteica, sorteando las dificultades de la aplicación de técnicas de proteómica convencional. Cabe destacar aquí, que aunque la relación entre la tasa de traducción de un ARNm y los niveles de proteína en estado estacionario no es necesariamente lineal (puesto que existen varios eventos de regulación post-traduccionales), para una gran proporción de genes probablemente sí lo será. En el trabajo de Ingolia y colaboradores antes citado (Ingolia et al. 2009), se obtuvieron resultados que confirman una correlación entre los resultados del “ribosomal footprinting” y el proteoma de levaduras mucho mejor que la correlación con los niveles de ARNm obtenidos del transcriptoma. Así, las huellas polisomales permitirán obtener una imagen de la expresión génica global mucho más realista que la proporcionada por los ARNm en estado estacionario.

La aproximación genómica que plantea el proyecto general permitirá detectar la modulación de la expresión génica en los dos niveles mencionados: la estabilidad y la traductibilidad de los mensajeros. Por otro lado, este proyecto se propone emplear una estrategia de secuenciación profunda, lo que nos permitirá identificar el mayor número de genes hasta ahora posible, puesto que estas técnicas superan ampliamente en sensibilidad a los microarreglos, que ha sido la única tecnología utilizada para analizar perfiles de expresión génica en *T. cruzi* hasta el momento (Minning et al. 2009), con la excepción del trabajo en ARNs pequeños mencionado previamente (Franzén et al. 2011). De esta forma nuestra aproximación proporcionará un mayor rango dinámico de análisis, ofreciendo una visión más clara de la dimensión cuantitativa de la regulación de la expresión génica.

Finalmente, el abordaje genómico del ciclo celular, es decir, la posibilidad de conocer los genes que lo regulan, abre la posibilidad de identificar nuevos y más prometedores blancos de acción de drogas, que ganen en especificidad y efectividad del tratamiento (Myler 2008; Hammarton et al. 2003b; Grant 2008). Al mismo tiempo, la conjunción del análisis genómico y bioinformático permitirán predecir si alguna droga de uso clínico actual pueda ser eficaz también en el tratamiento de esta parasitosis. Esta estrategia de búsqueda de drogas acelera el proceso de producción y por lo tanto la llegada al paciente puesto varias etapas de evaluación, incluyendo las fases clínicas, ya estarían superadas (Crowther et al. 2010).

## 3| OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo General

Aportar al conocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan la regulación del ciclo celular en *Trypanosoma cruzi*.

#### 3.1.1 Objetivos Específicos

- Obtener poblaciones de parásitos enriquecidas en cada etapa del ciclo celular.
- Poner a punto un protocolo de aislamiento de ARNm asociado a Polirribosomas.

## 4 | MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivo de parásitos *Trypanosoma cruzi*

#### 4.1.1 Medio

El medio de cultivo conocido como LIT (del inglés *Liver Infusión Tryptose*) se preparó a partir de 4 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g de Infusión de hígado (*Liver Infusion Broth*, Difco™), 5 g Triptosa y 15 g de Extracto de Levadura. Se llevó a un volumen de 880 mL, se autoclavó y se agregó suero fetal bovino (SFB) (SIGMA-ALDRICH®) 10% final inactivado por calor, 2 g de glucosa, 25 mg de Hemina, 30 mg de Estreptomicina y 50 mg de Penicilina alcanzando un volumen final de 1 L.

#### 4.1.2 Cultivo

Considerando la disponibilidad de datos genómicos se decidió utilizar parásitos de la cepa Esmeraldo cI3 (Miles et al. 1977) para llevar a cabo el trabajo (El-Sayed et al. 2005a) (secuencias disponible en <http://tritrypdb.org>). De acuerdo una revisión reciente en el tema (Zingales et al. 2009), la cepa Esmeraldo cI3 corresponde al grupo TcII.

En este trabajo se utilizó únicamente el estadio epimastigota de *T. cruzi*. Estos parásitos se cultivaron en medio LIT (Castellani et al. 1967) suplementado con SFB y extracto de Levadura en una incubadora a 28 °C. Se repicó el cultivo cada 72 horas a fin de mantenerlo en fase exponencial de crecimiento. El recuento de células en el cultivo se realizó utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio de campo claro, con una previa fijación de los parásitos en *p*-formaldehído (PFA) 2 % en Buffer Salino de Fosfatos (PBS) (NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7 mM, Glucosa 6 mM, se llevó a pH 7,4) para inmovilizarlos y minimizar el riesgo de infección.



### 4.1.3 Curva de Crecimiento

Para comenzar a realizar una curva de crecimiento, se hizo un pasaje del cultivo que permitió obtener una suspensión celular de  $2 \times 10^6$  parásitos/mL. Se crecen los parásitos a 28°C en medio LIT y se determina la concentración de células en el cultivo cada 24 horas, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento.

## 4.2 Manipulación de Ácidos Nucléicos

### 4.2.1 Mantenimiento de la integridad del ARN

Para evitar la degradación del ARN a estudiar, se trabajó en condiciones especiales para prevenir la contaminación y acción de las RNAsas. Se utilizó material de plástico estéril descartable (tubos, puntas de pipetas, etc). El material líquido se trató con dietilpírocarbonato (DEPC); brevemente, se agregó DEPC para una concentración final de 0,1 %, se incubó con agitación por 24 horas y luego se autoclavó para inactivar trazas del compuesto ya que es deletéreo para la salud. El material de plástico no descartable (por ejemplo, las cubas de electroforesis) se trató con una solución de 3 %  $H_2O_2$  durante 15 minutos y luego se enjuagó con agua tratada con DEPC.

### 4.2.2 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el reactivo comercial TRIzol® (Invitrogen™, Life Technologies©) y se siguió las indicaciones del fabricante. Este procedimiento permite la separación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos por su solubilidad diferencial en los solventes orgánicos. Brevemente, se agregó TRIzol® en una relación de volumen 9:1 (TRIzol®:muestra), o 900  $\mu$ L de TRIzol® para resuspender un pellet de  $1 \times 10^6$  parásitos. Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ L de Cloroformo por cada 1 mL de la mezcla anterior. Se centrifugó a 12.000 *g* durante 15 minutos para separar las fases y se colectó la fase

acuosa en donde se encuentra el ARN. Este ARN se precipitó luego mediante el agregado de 1 volumen de isopropanol y se centrifugó a 12.000 *g* durante 15 minutos. Por último, se lavó el pellet con etanol 75 %, se centrifugó a 7.500 *g* durante 5 minutos y se descartó el etanol por completo. Se dejó secar el pellet al aire a temperatura ambiente y finalmente el ARN obtenido se resuspendió en Agua libre de ARNasas (SIGMA-ALDRICH®).

#### 4.2.3 Cuantificación de ARN

Para cuantificar el ARN presente en la muestra se midió la absorbancia de las mismas de luz ultravioleta (UV) en un espectrofotómetro de microvolúmenes (ASP-3700, ACTGene™). A partir de la absorbancia a 260nm ( $A_{260}$ ) se calculó la concentración de ARN teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ARN, siempre que la relación  $A_{260}/A_{280}$  sea mayor a 1,8, lo cual indica que la muestra tiene un nivel aceptable de proteínas para llevar a cabo las técnicas de biología molecular.

#### 4.2.4 Electroforesis en gel de Agarosa

El ARN obtenido se analizó por electroforesis en gel de Agarosa al 1 % preparado en Buffer TAE (Tris-HCl 0,04 M, EDTA 0,50 mM, y ácido acético hasta alcanzar un pH de 7,2). La corrida electroforética se efectuó en el mismo buffer a 7,5 Voltios/cm durante el tiempo necesario para que las bandas se resolvieran adecuadamente. A las muestras se les adicionó buffer de carga (Glicerol 50 %, EDTA 1 mM pH 8, Azul de bromofenol 0,25 %, Xilene cianol 0,25 % en agua tratada con DEPC) y se sembraron 10  $\mu\text{L}$  en cada pocillo del gel. Luego de la corrida el gel fue teñido con Bromuro de Etidio (BrEt) y el ARN se visualizó bajo luz UV.

## 4.3 Sincronización de Cultivos

### 4.3.1 Protocolo de Sincronización

La sincronización de cultivos se basó en el método de depleción del pool de desoxiribonucleótidos con hidroxurea descrito por Galanti y colaboradores (Galanti et al. 1994). Brevemente, un cultivo de epimastigotas en fase de crecimiento exponencial (entre  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  parásitos/mL) se lavó 2 veces en 1 volumen de PBS frío centrifugando a 700 g a 4 °C durante 10 minutos. Los parásitos se resuspendieron en medio LIT con 20 mM de Hidroxurea y se incubaron a 28 °C por al menos 24 horas (el tiempo de incubación se puso a punto para la cepa Esmeraldo durante este trabajo). Luego el cultivo se lavó 2 veces con PBS frío para eliminar la droga, se resuspendió en medio LIT fresco y se incubó a 28 °C, colectándose las muestras a diferentes tiempos. Debido a que la hidroxurea provoca un arresto en el punto de control G1/S (Koç et al. 2004), la población que se obtiene inmediatamente después del lavado (0 horas) contiene parásitos mayoritariamente en la etapa G1. Entre las 6-8 horas se obtiene una población mayoritaria en parásitos en fase S y entre las 12-14 horas la fase G2 (Galanti et al. 1994).

### 4.3.2 Análisis por Inmunofluorescencia

Para la colecta de las muestras se tomó 1ml del cultivo sincronizado, que contiene aproximadamente  $5 \times 10^6$  parásitos, se lavó 3 veces en PBS frío y se resuspendió a una concentración final de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL. Luego se depositaron 20  $\mu$ L de dicha suspensión en un portaobjetos de superficie poli-L-lisina (modelo #618-Frost, TEKDON®) y se permitió la decantación de los parásitos. A continuación, se retiró suavemente el PBS pipeteando desde un extremo de la gota para evitar remover los parásitos decantados. Inmediatamente se fijaron los parásitos mediante el agregado de 50  $\mu$ L de PFA 2 % en PBS, seguido de una incubación a 4 °C en cámara húmeda durante 20 minutos. Posteriormente, se lavó 3 veces con PBS en gota a temperatura ambiente. Luego se procedió a una incubación en Tritón X-100 0,1 % en PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos para

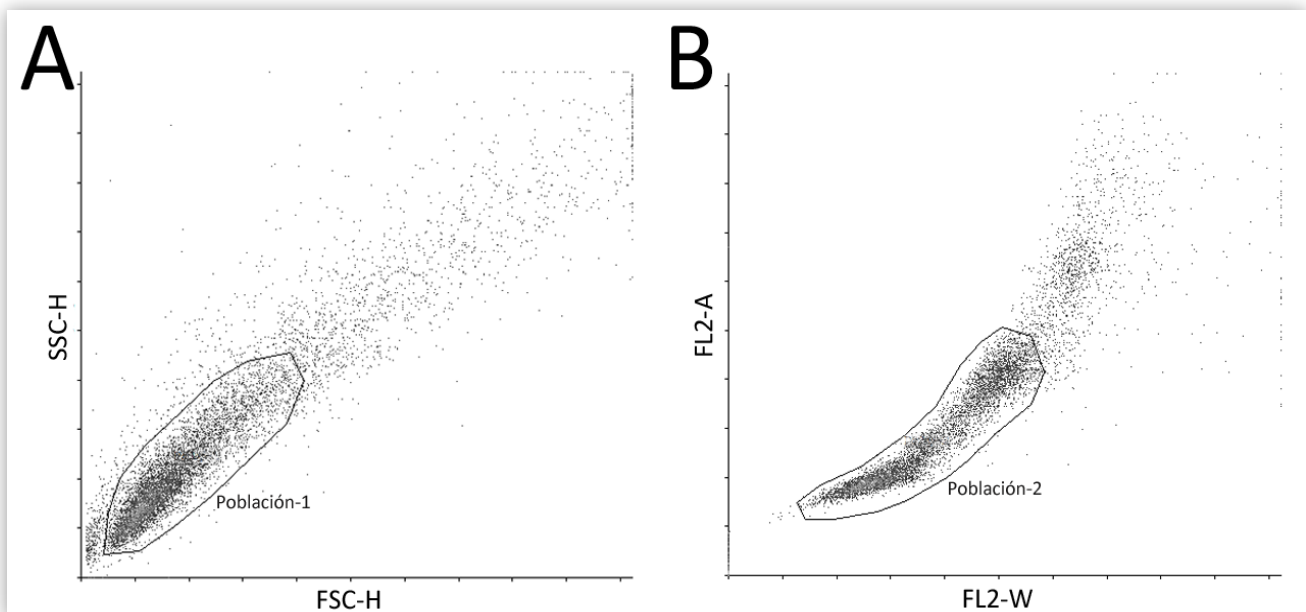
la permeabilización de los parásitos. Después, se lavó 3 veces con albúmina sérica bovina (BSA) 1 % en PBS a temperatura ambiente y se incubó en dicha solución bloqueante en las mismas condiciones durante 15 minutos. El anticuerpo primario utilizado, denominado mAb25, reconoce un proteína flagelar de *T. cruzi* (Elias et al. 2007) y fue proporcionado por el Dr. Schenkman. Se utilizaron 3 µg de mAb25 por cada 1 mL de PBS con BSA 1 % y se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se lavó 3 veces con PBS-BSA 1 % a temperatura ambiente y luego se incubó con el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de ratón conjugado a la sonda fluorescente Alexa Fluor® 546 (Cat. [A-11060](#), Invitrogen™, Life Technologies©) en una dilución 1/100 a temperatura ambiente durante 40 minutos en presencia de 10mg/mL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para el marcado del ADN tanto nuclear como mitocondrial del parásito. Los preparados se observaron en un microscopio de epifluorescencia (NIKON Eclipse 80i) y las imágenes se colectaron utilizando el software NIS elements AR 3.1 (NIKON Imaging Software).

#### 4.3.3 Análisis por Citometría de flujo

Se tomó una muestra de  $1 \times 10^6$  parásitos y se lavó 2 veces en PBS frío centrifugando a 1000 g a 4 °C durante 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 150 µL de PBS a 4 °C mezclando suavemente para evitar los agregados de parásitos. Luego se fijaron por el agregado lento de 350 µL de Etanol Absoluto a -20 °C. Finalmente, se mezcló 3 veces por inversión y se dejó a 4 °C por no menos de 24 horas antes de proceder a la tinción.

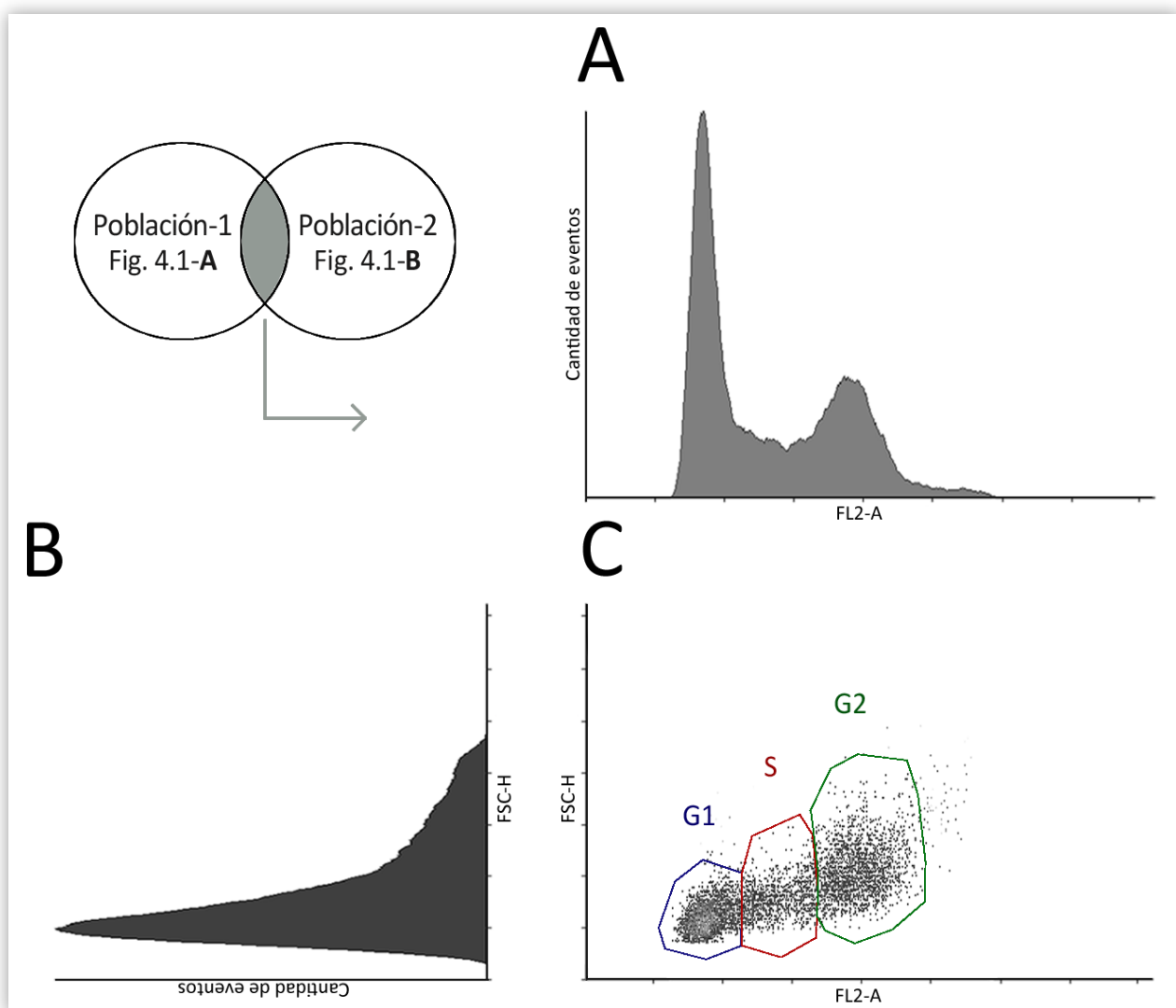
Los parásitos fijados se centrifugaron a 700 g a 4 °C durante 10 minutos, se descartó el Etanol y se resuspendió en 500 µL de solución de tinción (EDTA 2 mM, ARNasa-A 0,2 µg/mL, Ioduro de Propidio 50 µg/mL) homogenizando cuidadosamente. Finalmente se incubó esta mezcla a 37 °C durante 30 minutos y luego se conservaron a 4 °C hasta el momento del análisis citométrico. Se empleó un Citómetro de flujo BD FACScalibur™ (BD Biosciences), utilizando el software provisto por la compañía BD Cell Quest Pro™ provisto por la compañía.

El objetivo de este análisis citométrico fue determinar el contenido de ADN por célula a partir de lo cual se podrá calcular la proporción de parásitos en las distintas fases del ciclo celular. En primer lugar, se localizó a la población de parásitos en un gráfico de análisis biparamétrico (gráfico de puntos, de inglés Dot plot) para la dispersión frontal de la luz (FSC, del inglés Forward Scatter) contra la dispersión lateral de la luz (SSC, del inglés Side Scatter), variables que dependen de las características morfológicas de las células (**Figura 4.1-A**). Luego efectuó una selección de dobletes, es decir, la identificación de los eventos que corresponden a 2 células adheridas, que pasan juntas por el detector y por lo tanto se registran como un único evento. Para esto se realiza otro gráfico Dot-plot usando los parámetros del detector de la fluorescencia para el Ioduro de Propidio, que son el área (FL2-A) y el ancho (FL2-W) del pulso registrado (**Figura 4.1-B**). En este gráfico se seleccionan las poblaciones que forman 2 grupos homogéneos, mientras que se excluyen aquellos eventos que cuentan con valores mayores de fluorescencia (tanto para FL2-A como para FL2-W), dado que corresponden a agregados celulares.



**Figura 4.1.** Selección de las poblaciones de parásito para el análisis de ciclo celular. **A)** Selección con un Dot-plot para la dispersión frontal de luz (FSC-H) contra la dispersión lateral de luz (SSC-H). **B)** Exclusión de dobletes en un Dot-plot para los parámetros correspondientes al área (FL2-A) y al ancho (FL2-W) del pulso de intensidad de Fluorescencia debida a la tinción con Ioduro de Propidio. Las regiones enmarcadas contienen los eventos seleccionados para el análisis de contenido de ADN.

Posteriormente, a partir de los eventos que resultan de la intersección de las poblaciones seleccionadas (Población-1 y Población-2 de la **Figura 4.1**), se pasó a analizar la intensidad de fluorescencia (FL2-A) para cada célula en un Histograma (gráfico de análisis monoparamétrico) (**Figura 4.2-A**), que cuenta la cantidad de eventos para cada valor de fluorescencia. Los dos picos que se aprecian en la **Figura 4.2-A**, corresponden el primero (de menor valor de Fluorescencia) a la población con un valor 2C de cantidad de ADN compuesta de células en G1, y el segundo a la población de 4C de células en G2. Mientras que para valores intermedios de cantidad de ADN (entre 2C y 4C) se encuentra la



**Figura 4.2. Determinación de la proporción de parásitos en cada fase del ciclo.** Trabajando sobre los eventos de la intersección de las poblaciones seleccionadas en la Figura 4.1 se analiza la valores de fluorescencia (FL2-A, cuyo histograma se observa en A) contra la dispersión frontal de luz (FSC-H, cuyo histograma se muestra en B) y se construye el Dot-plot que se muestra en C. En este último se seleccionan las tres poblaciones con valores crecientes de intensidad de fluorescencia que se corresponden con poblaciones G1, S, y G2 tal como se muestra en la figura.

población de parásitos que cursan la fase S. Para obtener valores cuantitativos de la proporción de parásitos que se encuentran en cada fase del ciclo se siguió el protocolo diseñado por Dvorak (Dvorak 1993). Se construyó el dot-plot que se observa en la **Figura 4.2-C**, que evalúa al mismo tiempo la intensidad de fluorescencia (FL2-A) y el tamaño celular (FSC). Tomando como referencia los picos máximos observados en el histograma de fluorescencia (**Figura 4.2-A**) se seleccionan las poblaciones correspondientes a cada fase del ciclo (G1, S, G2) y se determina la cantidad de parásitos que se encuentra en cada una de estas etapas. Para llevar a cabo estos análisis se utilizó el software de uso libre Cyflogic© 1.2.1 (Cyflo Ltd).

## 4.4 Aislamiento de Polisomas

El aislamiento de la fracción de ARNm asociados a poliribosomas, de aquí en más denominada “fracción polisomal”, se basó en el protocolo descrito por Brecht y Parsons (Brecht et al. 1998) con diversas modificaciones para adaptarlo al equipamiento disponible. Durante este protocolo, a no ser que se indique lo contrario, se trabaja en frío para preservar los complejos moleculares que son de interés fundamental para los fines del experimento. Asimismo, a partir del paso de lisis celular en adelante se tomaron las medidas necesarias para preservar la integridad de los ARNs (ver sección 3.2.1).

### 4.4.1 Obtención de extractos celulares

Para mantener a los ribosomas ensamblados sobre los mensajeros a lo largo del aislamiento de la fracción polisomal, el cultivo se incubó en LIT suplementado con 100 µg/mL de Cicloheximida a 28 °C durante 10 minutos. La Cicloheximida es un inhibidor de la actividad aminoacil-transferasa en la subunidad mayor del Ribosoma (Baliga et al. 1969), por lo tanto, el agregado de esta droga hace que los ribosomas se estabilicen sobre el ARNm bloqueando la elongación de la traducción.

Un total de  $1 \times 10^9$  parásitos se lavaron 2 veces en buffer TKM (Tris 100 mM, KCl 300 mM,  $MgCl_2$  10 mM y se llevó a pH 7,4) suplementado con cicloheximida 100  $\mu g/mL$  (TKM-Cicloheximida) centrifugando a 1000  $g$  durante 10 minutos. Los parásitos se resuspendieron en 900  $\mu L$  de TKM-cicloheximida con Heparina 10  $\mu g/mL$  y se adicionaron 100  $\mu L$  de buffer de Lisis (NP40 1 %, Sacarosa 0,2 M, Inhibidor de RNAsas (RNAsin) 1000 U/mL en buffer TKM) siempre trabajando en frío. A modo de control, un cultivo, hasta el momento trabajado en condiciones equivalentes, se resuspendió en buffer de lisis sustituyendo la cicloheximida por EDTA 500 mM. El EDTA se agregó para que mediante el quelado de iones divalentes, como el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$ , se logró desensamblar las subunidades ribosomales y por lo tanto los polirribosomas. Se homogenizó por pipeteo y el lisado se centrifugó a 16000  $g$  a 4 °C durante 5 minutos para sedimentar tanto núcleos como mitocondrias del parásito. Finalmente, se conservó el sobrenadante que corresponde a la fracción citosólica en donde se encuentran los polisomas.

#### 4.4.2 Obtención de fracciones sub-celulares

Para llevar a cabo el aislamiento de los polisomas se utilizó un gradiente lineal de Sacarosa. Para esto se prepararon 2 soluciones, una de 15 % y otra de 60 % de Sacarosa en buffer TKM-cicloheximida 100  $\mu g/mL$  o TKM-EDTA 500 mM. Para cada gradiente se cargaron 1,8 mL de cada solución en un formador de gradientes y se mezclaron utilizando una bomba peristáltica a un flujo no mayor a 0,5 mL/min con un agitador magnético para permitir la correcta homogenización mientras la solución se descarga en un tubo de 5 mL de ultracentrífuga Beckman SW60Ti (Beckman Coulter, Inc).

Una vez armados y enfríados los gradientes de sacarosa, se cargaron 200  $\mu L$  del extracto citosólico en la superficie superior del gradiente. Los tubos se equilibraron a nivel de miligramo y se colocaron en el rotor Beckman SW60Ti (Beckman Coulter, Inc). Luego se centrifugó a 130.000  $g$  a 4°C durante 150 minutos. Por último, se colectaron fracciones de 100  $\mu L$  a partir del margen superior del gradiente, utilizando una bomba peristáltica a un flujo entre 0,1 y 0,5 mL/min, y se pasó a medir la absorbancia a 254 nm de las mismas en un espectrofotómetro de microvolúmenes (ASP-3700, ACTGene™) para analizar la presencia de ácidos nucleicos.



## 5 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

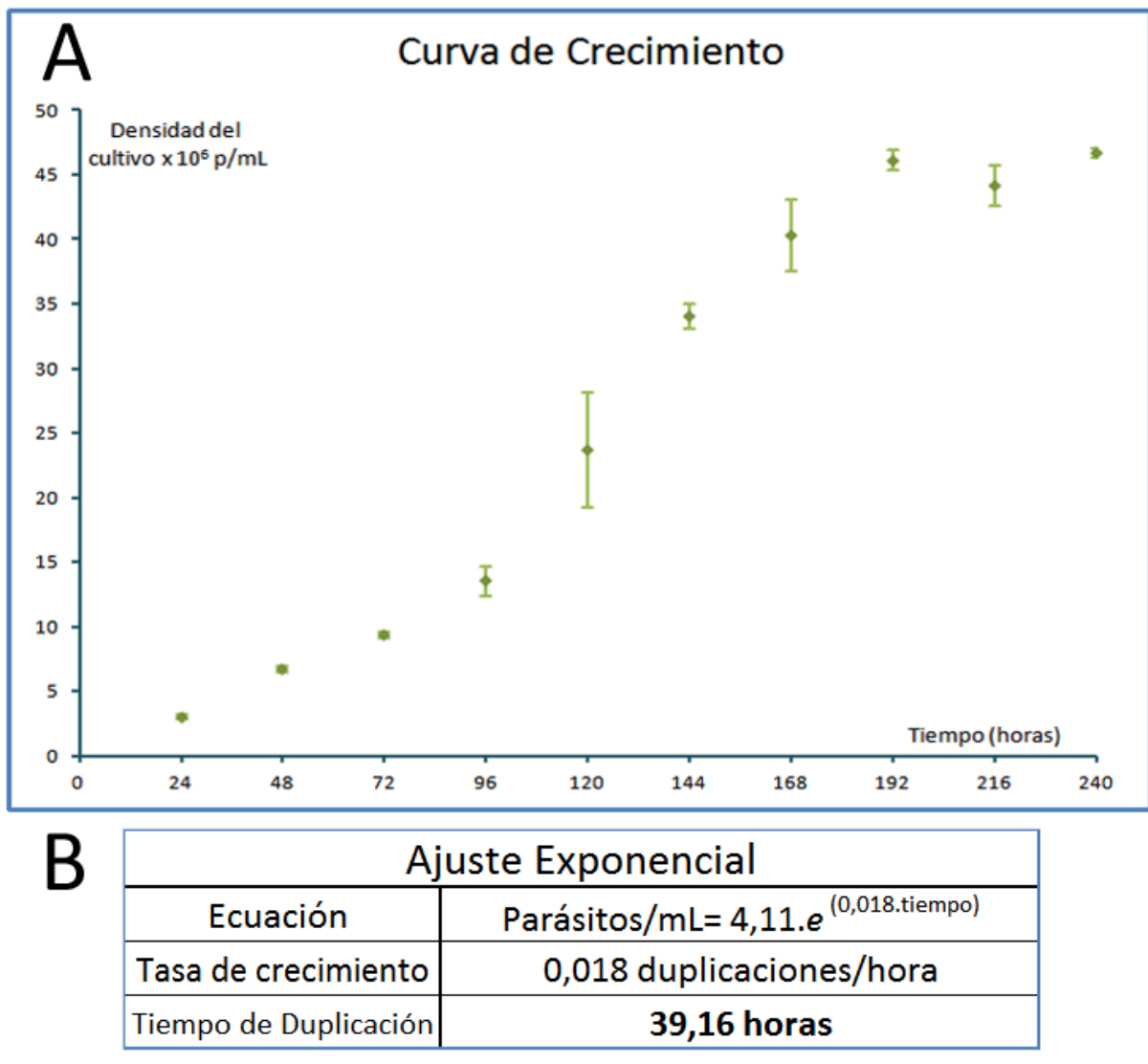
### 5.1 Sincronización de Cultivos de Epimastigostas de *T. cruzi*

#### 5.1.1 Determinación del tiempo de duplicación de los cultivos

Para la realización de este trabajo fue esencial adquirir experiencia en el cultivo de *T. cruzi*. Por otro lado, el tiempo de duplicación de los parásitos es un dato importante al momento de diseñar los experimentos de sincronización, puesto que el tiempo de exposición a las drogas que detienen el ciclo celular debe ser mayor o igual al de la duración del ciclo celular del organismo, de modo de garantizar que todas las células atraviesen el punto de control afectado por la misma y permitir una buena eficiencia de sincronización. Con estos propósitos se realizaron curvas de crecimiento tal como se describió en la sección Materiales y Métodos. . En el experimento cuyos resultados se muestran en la **Figura 5.1** se partió de un cultivo en fase exponencial que fue diluido para obtener una suspensión inicial de  $2 \times 10^6$  parásitos/mL. Luego se determinó la concentración de parásitos en el cultivo cada 24 horas y se graficó la densidad celular en función del tiempo como se observa en la **Figura 5.1-A**.

Los valores obtenidos en el experimento se ajustaron a un comportamiento exponencial utilizando el servidor <http://www.doubling-time.com/> (Roth 2006), y los resultados obtenidos se observan en la **Figura 5.1-B**. Para realizar esto se utilizaron los valores tomados en la fase exponencial de crecimiento que corresponden a 48, 72, 96, 120 y 144 horas en el experimento antes mencionado. Se obtuvo una relación matemática entre las variables densidad celular del cultivo y tiempo del siguiente tipo:

$$\text{Densidad (parásitos/mL)} = 4,11 \cdot e^{0,018 \cdot \text{tiempo(horas)}}$$



**Figura 5.1.** Determinación del tiempo de duplicación de los cultivos de Epimastigotas de la cepa Esmeraldo. **A)** Se determinó durante 10 días la concentración de parásitos de un cultivo de Epimastigotas de *T. cruzi*, a partir de un cultivo inicial de  $2 \times 10^6$  p/mL. Se muestran valores promedios y desviación estándar de los mismos correspondientes a duplicados experimentales. **B)** Ajuste exponencial realizado en el servidor <http://www.doubling-time.com/> (Roth 2006) el cual utiliza una regresión exponencial descrita por Weisstein disponible en el servidor <http://mathworld.wolfram.com/LeastSquaresFittingExponential.html> (Weisstein 1999).

La constante 0,018 en esta aproximación hace referencia a la tasa de crecimiento que tiene el cultivo, es decir el número de duplicaciones que ocurren por unidad de tiempo, por lo cual el cultivo crece a una tasa de 0,018 duplicaciones por hora. El tiempo de duplicación depende de esta constante de la siguiente forma:

$$\text{Tiempo de duplicación} = \ln(2) / 0,018$$

De esta forma se obtuvo un tiempo de duplicación de 39 horas, el cual se puede tomar como una estimación de la duración del ciclo celular de estos organismos. Lo cual es válido considerando que todas las células del cultivo estén ciclando activamente.

### 5.1.2 Sincronización de cultivos con Hidroxiurea

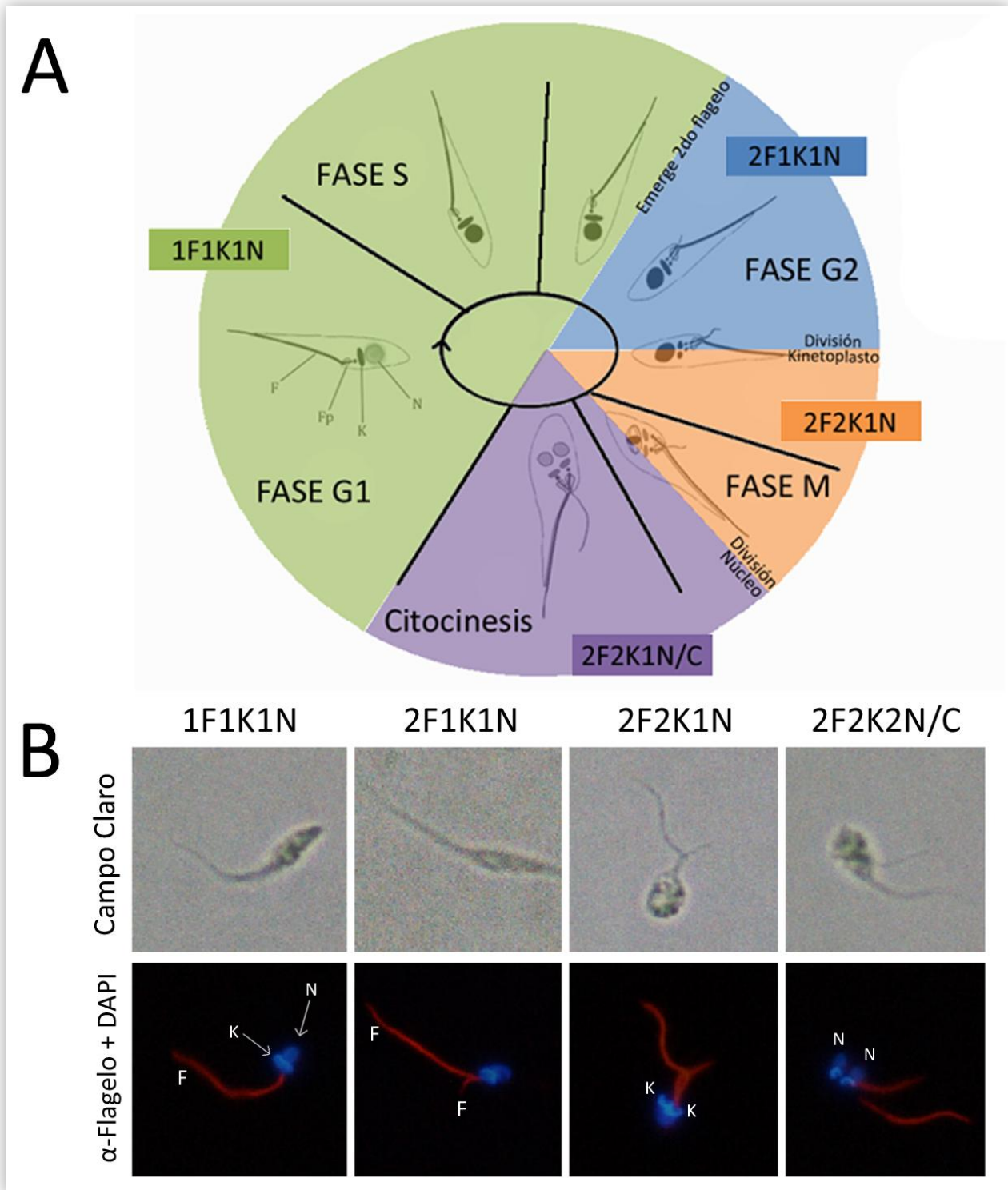
El objetivo a largo plazo de este trabajo fue poner a punto un método para obtener poblaciones de alrededor de  $1 \times 10^7$  parásitos enriquecidas al menos un 70% en uno de cada uno de los estadios del ciclo celular. Estos son los parámetros que nos permitirán estudiar adecuadamente los cambios en la expresión génica en el transcurso del ciclo celular mediante secuenciación masiva. Si bien existen una variedad de métodos para esto (Walker 1999; Davis et al. 2001), la sincronización por exposición a Hidroxiurea es un método clásico que ya fue puesto a punto para *Trypanosoma cruzi* y otros kinetoplastidos (Galanti et al. 1994). Este ensayo requiere poco equipamiento específico, es relativamente barato y permite obtener la escala y la eficiencia que necesitamos. Sin embargo, se tuvo que poner a punto esta metodología para la cepa Esmeraldo debido a que la misma no se había ensayado previamente, y porque se sabe que el método es sensible a muchas variables de la replicación, como por ejemplo el tiempo de duplicación y el contenido de ADN, el cual es altamente variable entre cepas de *T. cruzi* (Lewis et al. 2009). Por esta razón se sincronizaron cultivos de *T. cruzi* de la cepa Esmeraldo mediante el método de Hidroxiurea, probando inicialmente incubaciones de 24 horas (como se habían realizado previamente en el laboratorio para la cepa CL-Brener (Duhagon et al. 2009)) y tomas de muestras a los tiempos 0, 6 y 18 horas post-lavado de la hidroxiurea, como se reportó en el trabajo de Galanti y colaboradores para la cepa Sylvio-X10/7 (Galanti et al. 1994). Estos tiempos fueron elegidos antes de haberse determinado el tiempo de duplicación de la cepa Esmeraldo.

Existen diferentes métodos para determinar la etapa del ciclo celular en la que se encuentra una célula (Gray et al. 1987). Nosotros iniciamos este trabajo utilizando la identificación basada en marcadores citológicos, puesto que en el laboratorio existía experiencia en esta aproximación (Duhagon et al. 2009).

En las muestras sincronizadas con hidroxurea se estudió entonces la presencia de marcadores celulares del ciclo celular mediante microscopía de fluorescencia. Paralelamente se siguió un procedimiento idéntico con una población asincrónica en crecimiento exponencial, sin exposición a la droga, que fue utilizada como control del experimento. Las células se marcaron con el anticuerpo mAb-25 para revelar el flagelo y en simultáneo se realizó una tinción con DAPI, para visualizar el ADN nuclear y el ADN mitocondrial (kinetoplasto). Estos marcadores permiten cuantificar los flagelos, núcleos y mitocondrias que se observan por célula, lo cual nos permite definir cuatro “estados morfológicos”. El estado morfológico **1F1K1N** (donde **F** son los flagelos, **K** los kinetoplastos y **N** los núcleos) comprende las fases G1, S y al principio de G2, en el cual los parásitos cuentan con 1 única copia de estos organelos. Al inicio de G2, se duplica el cuerpo basal y comienza a emerger el segundo flagelo, momento en que los parásitos se encuentran en un estado **2F1K1N**. La segregación del ADN mitocondrial se da al final de la fase G2 y a partir de este evento se pueden observar 2 kinetoplastos, es decir, un estado **2F2K1N**. Por último, al entrar en Mitosis segrega el ADN nuclear y se aprecia claramente la presencia de 2 núcleos, conformando el estado **2F2K2N**. Por este método el final de la mitosis no puede discernirse claramente de la etapa de Citocinesis y por lo tanto ambas etapas se consideran en conjunto. Aunque estos cuatro estados morfológicos no se corresponden exactamente con las cuatro etapas clásicas del ciclo celular, correlacionan parcialmente con ellas del modo que se representa en la **Figura 5.2**.

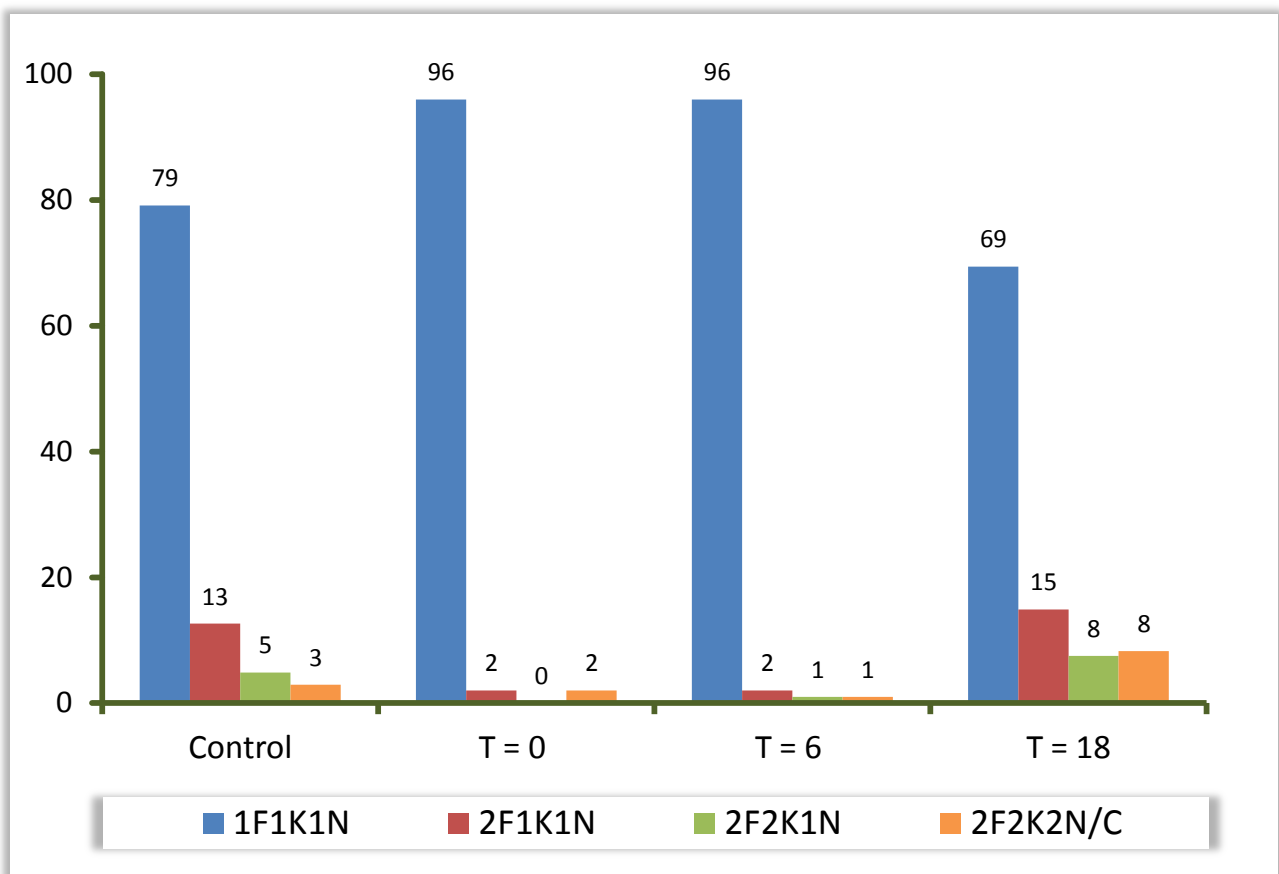
Para cada muestra tomada a los tiempos establecidos, una vez removida la hidroxurea se clasificaron 100 parásitos en los cuatro estados morfológicos discernibles por los marcadores empleados, determinado así la proporción de parásitos en cada estado, a efectos de evaluar la eficiencia de la sincronización. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5.3**.

En primer lugar, se observa que la composición de los cultivos a lo largo del experimento de sincronización se vio afectada por la exposición a la hidroxurea, resultando en poblaciones compuestas de diferentes proporciones de parásitos en cada estado. Para la población asincrónica se observó que un 79 % de los parásitos se



**Figura 5.2. Análisis del ciclo celular por marcadores celulares. A)** Esquema del ciclo celular de *T. cruzi*, que muestra los cambios morfológicos que se dan a lo largo del ciclo que son de interés para esta aproximación. Las áreas coloreadas superpuestas al dibujo indican los “estados morfológicas” discernibles por el análisis de marcadores celulares estudiados mediante inmunofluorescencia. El esquema fue tomado y modificado de Elías et al. (Elías et al. 2007). **B)** Imágenes representativas de los cuatro “estados morfológicos” que discriminan los marcadores celulares. En rojo se observa el flagelo marcado con el Anticuerpo mAb-25 y en Azul se observa el ADN marcado con DAPI. En esta figura **F** representa los flagelos, **K** los kinetoplastos y **N** los núcleos. Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio de epifluorescencia NIKON Eclipse 80i con el objetivo 40X y procesadas utilizando el software NIS elements AR 3.1 (NIKON Imaging Software).

encuentran en el estado morfológico 1F1K1N. Dado que este estado se corresponde con las etapas G1, S y G2 temprana, y que se ha descrito que estas etapas en conjunto representan aproximadamente un 75 % de la duración total del ciclo celular de *T. cruzi* (Elias et al. 2007) nuestro resultado está de acuerdo a lo esperado en base a la literatura. Por otro lado, el 21 % restante de los parásitos se repartió en un 13 % de parásitos en una G2 media (2F1K1N), un 5% en G2 tardía (2F2K1N), y finalmente un 3% de parásitos en el proceso de división, es decir, cursando mitosis y citocinesis (2F2K2N/C). Estos resultados confirman también los resultados previamente reportados en estudios previos en tripanosomátidos (Elias et al. 2007).



**Figura 5.3.** Distribución de los cultivos sincronizados en los cuatro “estados morfológicos” del ciclo celular. Se incubaron durante 24 horas en hidroxurea cultivos de epimastigotas de *T. cruzi*, se resuspendieron en medio sin droga durante 0, 6 y 18 horas y se analizaron por inmuno fluorescencia en paralelo con una población asincrónica control. Se determinaron los estados morfológicos de 100 células para cada muestra. En las ordenadas se expresa el porcentaje de células en los cuatro estados morfológicos discernibles por el análisis de marcadores celulares (1F1K1N, 2F1K1N, 2F2K1N, 2F2K2N/C; donde **F** es el flagelo, **K** el kinetoplasto y **N** el núcleo).

En cuanto a la población a las 0 horas luego del tratamiento con hidroxurea se pudo observar un aumento en la cantidad de parásitos en el estado morfológico 1F1K1N en

comparación con el cultivo asincrónico control, alcanzando el 96% de parásitos. A su vez se constató una disminución concomitante de los parásitos en los otros estados, que en conjunto aportaron el 4 % restante. Estos resultados son consistentes con la detención del ciclo celular mediada por la hidroxurea, ya que a tiempo 0 horas se espera que la mayoría de los parásitos estén arrestados en el punto de control G1/S, y por lo tanto muestren una morfología 1F1K1N. A las 6 Horas post-tratamiento también muestra un 69 % de parásitos 1F1K1N y el 4% restante distribuido en las otras etapas. Este resultado es acorde al que se esperaba, ya que los parásitos deben continuar el ciclo y alcanzar la etapa S al cabo de estas 6 horas luego de ser incubados en el medio fresco (Galanti et al. 1994), y en dicha etapa también demostrar una morfología correspondiente al estado 1F1K1N. En la última muestra, tomada a las 18 horas post-tratamiento, se observó un 69 % de los parásitos en el estado 1F1K1N, lo que representa una disminución del 10% con respecto a la población asincrónica y del 27% con respecto a las poblaciones a tiempo 0 y tiempo 6. A la misma vez se observó un aumento de las morfologías restantes para dar un 15% de parásitos en una G2 media (2F1K1N), y un 8% tanto para G2 tardía (2F2K1N) como para mitosis/citocinesis (2F2K2N/C). Se ha reportado que las poblaciones de *T. cruzi* sincronizadas con hidroxurea alcanzan la etapa G2 a las 12 horas (Galanti et al. 1994). Nosotros no pudimos coleccionar este punto de tiempo en este experimento. Sin embargo, a las 18 horas se espera que una gran parte de las células hayan sido capaces de atravesar G2 y mitosis y comenzar el siguiente ciclo. La proporción de estados morfológicos encontrada en este experimento nos indica que el protocolo realizado con la cepa Esmeraldo permite que las células superen el arresto inducido por la hidroxurea, alcancen las etapas más tardías del ciclo, como G2 y mitosis, e incluso sean capaces de retomar el segundo ciclo celular.

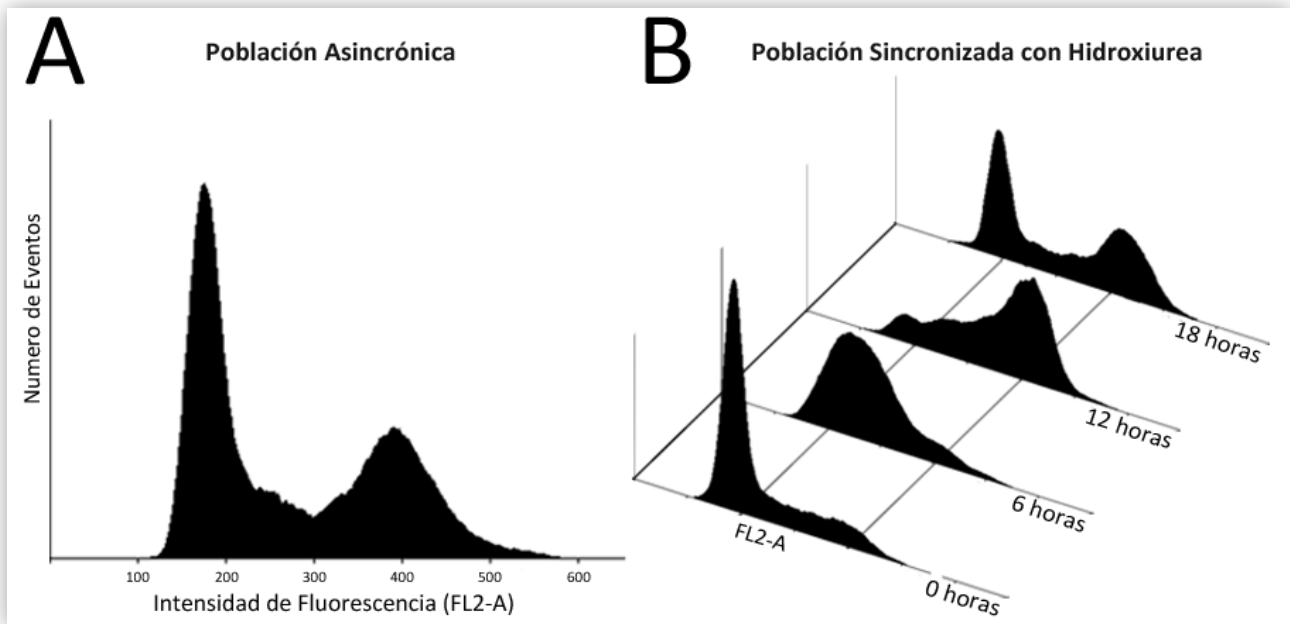
Los resultados obtenidos del análisis por inmunofluorescencia apoyan el hecho de que el protocolo que realizamos ocasiona la detención del ciclo celular en la transición G1/S, y que las células sean capaces de iniciar un segundo ciclo celular, tal como está descrito en la literatura. Sin embargo, la incapacidad de este método para discernir entre G1, S y G2 temprana (1F1K1N) puede conducir a conclusiones erróneas acerca de la proporción de células que hay en cada tiempo estudiado. Así como se espera que el aumento de parásitos en fase G1 para el tiempo 0 horas sea el causante del aumento de

los parásitos observados como 1F1K1N, no se puede descartar que parásitos en otras etapas (como fase S y fase G2 temprana) estén aportando a este estado morfológico. El mismo razonamiento se aplica a lo observado en el tiempo 6 horas y en parte también para las 18 horas. En un contexto de esta inespecificidad nuestros resultados son compatibles, por ejemplo, con el arresto irreversible de una sub-población importante de células, y también con la falta de arresto de las mismas; ambas posibilidades serían deletéreas para alcanzar el objetivo global de este trabajo, que es obtener poblaciones sincrónicas puras en un 70%. Sin embargo el ensayo de inmunofluorescencia, no solo cumplió con el objetivo de aprendizaje, sino también sugirió que el protocolo que estábamos realizando lograba producir el arresto del ciclo celular inducido por hidroxiquina en la cepa Esmeraldo, que fuera ensayada por primera vez aquí, puesto que no hay reporte sobre la misma en la literatura.

Dadas las limitaciones del análisis del ciclo celular por microscopía expuestas antes, se planteó la necesidad de utilizar otra estrategia de análisis de estas poblaciones que sea capaz de aportar datos sobre la composición de este estado 1F1K1N, es decir, que tenga una mayor capacidad para diferenciar las fases del ciclo. Con esta meta, se decidió analizar los estadios del ciclo celular estudiando el contenido de ADN de las células por citometría de flujo. A partir de la comparación de ambas estrategias se podrá obtener un panorama más claro de como el tratamiento con hidroxiquina afecta los cultivos de *T. cruzi*.

Nuevamente se sincronizaron cultivos mediante incubación con Hidroxiquina (Galanti et al. 1994). En esta instancia, dado que ahora sí se disponía de los datos de tiempo de duplicación de la cepa Esmeraldo (39 horas), y dadas las limitaciones horarias de la realización del protocolo, se decidió aumentar el tiempo de incubación probándose 28 y 32 horas. Luego se tomaron muestras a distintos tiempos post-lavado de la droga para determinar en qué momento se encontraban las poblaciones de mayor pureza para cada etapa del ciclo. Estas muestras, y la población asincrónica utilizada como control, se analizaron por citometría de flujo, estudiando el contenido de ADN por célula mediante la tinción con Ioduro de Propidio (Krishan 1975). En la **Figura 5.4** se muestra los perfiles de intensidad de fluorescencia obtenidos para las poblaciones analizadas en un primer experimento que constó de una incubación durante 28 horas en hidroxiquina y posteriores tomas de muestras cada 6 horas.



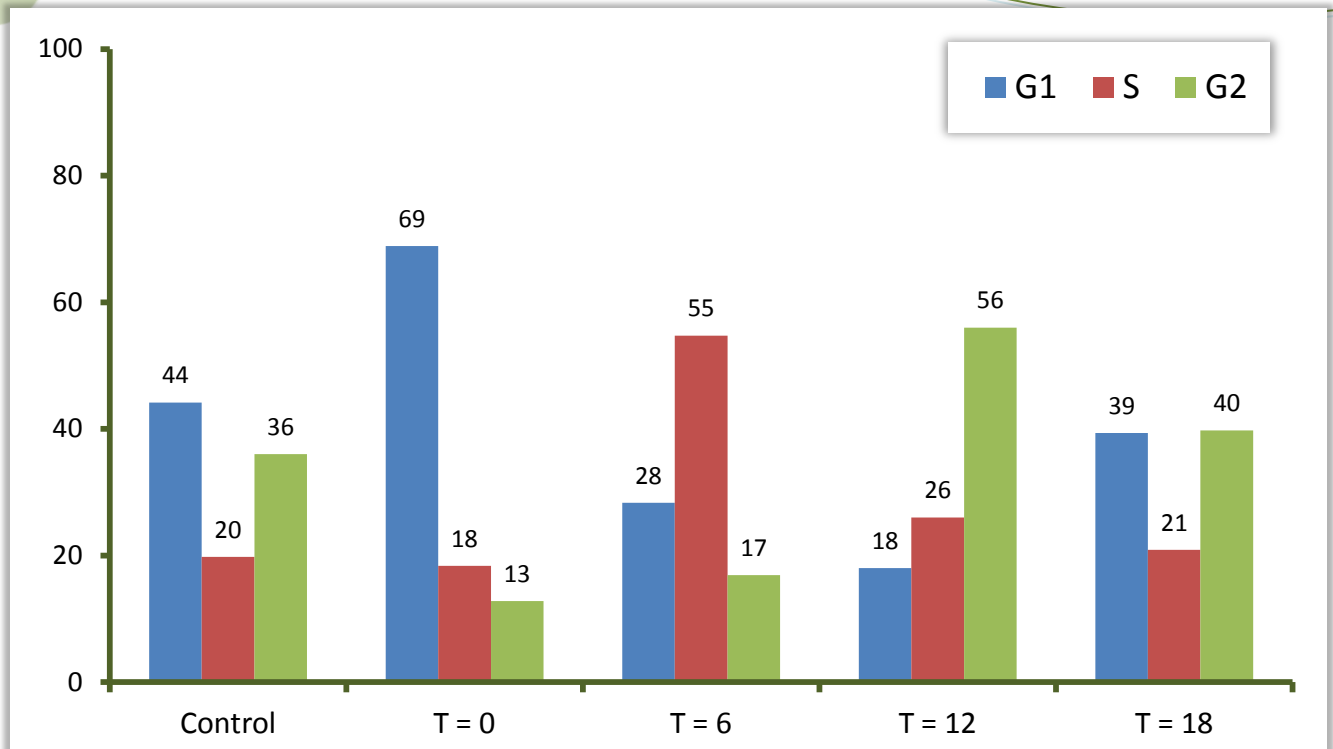


**Figura 5.4.** Perfiles de Contenido de ADN de cultivos sincronizados con hidroxiurea. Se observan los histogramas para el número de células (o eventos) en función de la Intensidad de Fluorescencia (FL2-A) en el canal de emisión del ioduro de Propidio **A)** Perfil de un cultivo asincrónico en fase de crecimiento exponencial. **B)** Perfil de cultivos sincronizados con hidroxiurea durante 28 horas y cultivados en medio fresco durante los tiempos indicados luego de la remoción de la droga.

En primer lugar, en la **Figura 5.4-A** se aprecia el perfil de distribución de fluorescencia del ioduro de Propidio de una población asincrónica típica (Dvorak 1993; Galanti et al. 1994). En este gráfico se observa el pico máximo a 200 Unidades Relativas de Fluorescencia (URF), correspondiente a parásitos con una cantidad 2C de ADN, es decir parásitos en G1. En el entorno de las 400 URF se puede apreciar un segundo pico, que corresponde a los parásitos con 4C de ADN, en este caso parásitos en G2. Para valores intermedios de Intensidad de Fluorescencia se observan parásitos en fase S. Por otro lado, en la **Figura 5.4-B**, donde se analizan los perfiles correspondientes a la población sincronizada con hidroxiurea, se puede observar claramente cómo, a las 0 horas post lavado de la droga, el pico de G1 se ve acentuado y desaparece el pico correspondiente a G2. Sin embargo quedan eventos distribuidos a mayores intensidades de fluorescencia que sugiere que una proporción de células no detuvo su ciclo frente a la adición de la droga y se encuentran en las fases S, G2/M. La población arrestada en el *checkpoint* G1/S luego se desplaza hacia mayores valores de Intensidad de Fluorescencia a medida progresa el ciclo celular. Se obtiene una población enriquecida en parásitos en fase S a las 6 horas post-lavado de la hidroxiurea, a pesar de que el pico máximo se ubica antes de las

300 URF (contenido 3C de ADN) indicando una fase S temprana. Sin embargo, la forma más achatada de este pico es una clara señal de que la fase de síntesis de ADN comenzó, puesto que las intensidades de fluorescencia de la se desplazan a valores por encima de 2C (entre 2C y 4C). A continuación se observa un pico en fase G2 para las 12 horas post-lavado, que en este caso si se ubica más centrado en el valor de Intensidad de Fluorescencia, 400 URF, que corresponde a 4C de ADN. Por último, a las 18 horas ya se puede observar como cierta fracción de la población alcanza una nueva fase G1, correspondiente al segundo ciclo celular, mientras que el resto todavía se encuentra en la G2 previa. De esta forma se concluye que mediante el método de exposición a hidroxiquina solo se obtiene un ciclo celular en que la población se comporta de forma sincrónica, perdiéndose esta sincronía al inicio de la segunda fase G1 observada, lo cual concuerda con lo reportado previamente en la literatura (Galanti et al. 2004). Como se describió previamente en Materiales y Métodos los resultados se pueden cuantificar mediante la selección de cuadrantes en un Dot-plot de Intensidad de Fluorescencia en función de la Intensidad en FSC-H (**ver 4.3.3**) y los valores obtenidos para cada etapa del ciclo se pueden observar en la **Figura 5.5**.

En primer lugar, los valores observados en la Figura 4.5 están acordes, tanto a lo observado en los perfiles discutidos previamente, como a los resultados obtenidos en el análisis por inmunofluorescencia. En relación a esto último, el 79 % de parásitos observados como 1F1K1N para la población asincrónica (**Figura 5.3**) debería estar distribuido entre aproximadamente el 44 % de fase G1, más el 20% de fase S y, por último, menos de la mitad del total de 36 % parásitos en G2 (**Figura 5.5**) debería de haberse identificado como 1F1K1N para que ambos análisis sean consistentes entre sí, lo cual es posible. Con respecto al 96 % de 1F1K1N observado tanto al tiempo 0 horas como a las 6 horas en la inmunofluorescencia, este también es consistente con las distribuciones obtenidas en la citometría. Primero, a las 0 horas de la citometría, la suma de las fase G1 y la fase S ya alcanza un 89 %, por lo que solo resta un 9 %, el cual en este caso representa más de la mitad del 13 % de parásitos en G2, debiéndose asumir entonces que los



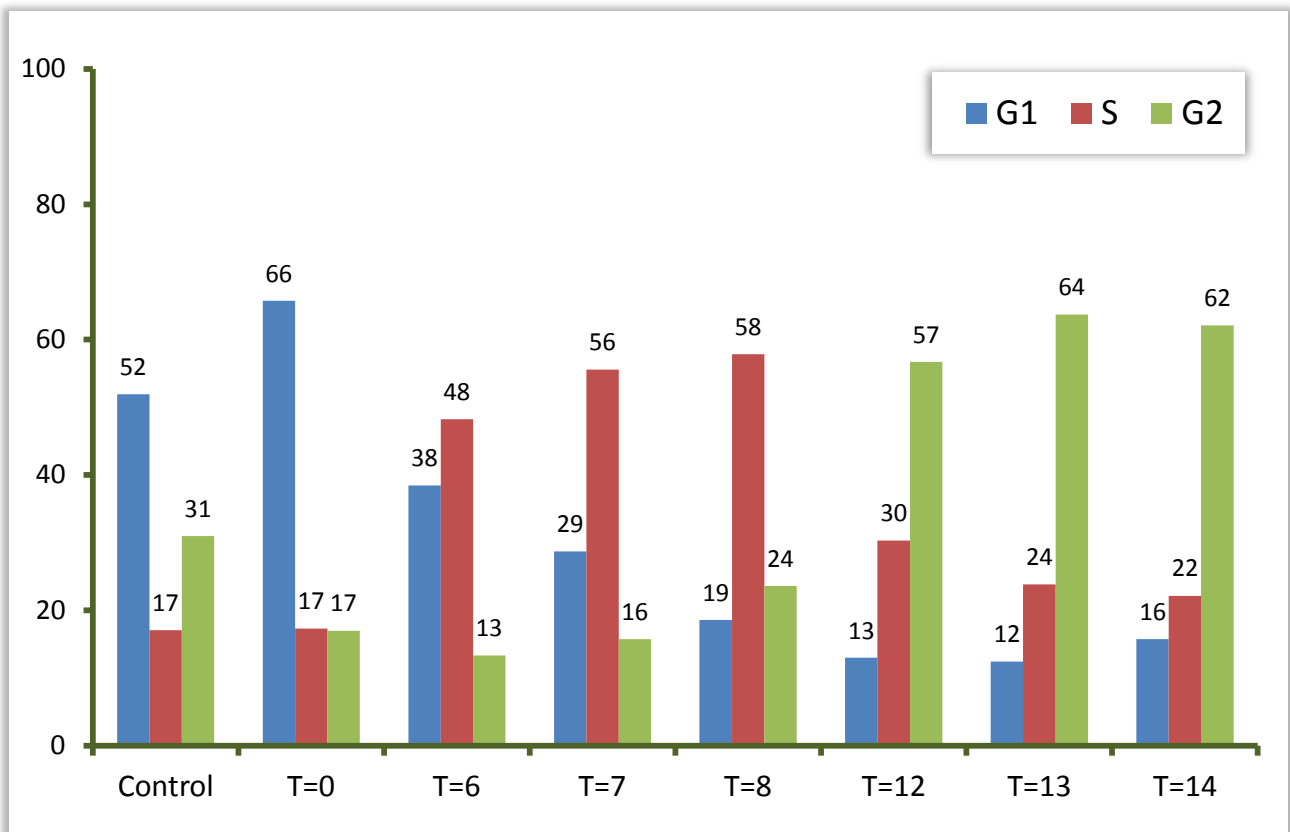
**Figura. 5.5.** Distribución de las poblaciones sincronizadas en las fases del ciclo según el contenido de ADN determinado por citometría de flujo. Se sincronizaron cultivos de *T. cruzi* mediante incubación con hidroxIUrea durante 28 horas. Luego se lavó la droga, se resuspendieron los parásitos en medio fresco y se recogieron muestras a los tiempo indicados ("T" en horas). Estas muestras y una población asincrónica (no expuesta a hidroxIUrea, Control) se analizaron por citometría de flujo determinando las fases del ciclo según su contenido de ADN. En las ordenadas se expresa el porcentaje de células en las tres fases del ciclo celular (G1, S, G2).

parásitos identificados como G2 no están igualmente distribuidos en esta etapa, sino que estaría más representada un sub-población de parásitos en una G2 temprana, previa a la formación del segundo flagelo. En segundo lugar, para las 6 horas de la citometría las fases G1 y S alcanzan un total de 83%, nuevamente requiriendo que la fase G2 este sobre representada por parásitos en una etapa temprana (con 13% de los 17% totales). Por último, el 69 % de parásitos observados como 1F1K1N a las 18 horas en las inmunofluorescencias se debe distribuir de una forma similar en el experimento al mismo tiempo analizado mediante citometría. En concreto, las fases G1 y S suman un total de 60 %, con lo que en este caso una minoría de los parásitos en G2 (9 % del total de 40%) estarían cursando una G2 temprana, por lo tanto el 31 % de los parásitos en esta G2 por citometría se distribuyen entre el 15 % de 2F1K1N, el 8 % de 2F2K1N y finalmente el 8 % de 2F2K2N/C.

En suma, estas dos aproximaciones para analizar la distribución de una población de células a lo largo del ciclo mostraron resultados consistentes entre sí, incluso considerando que las desviaciones que se pueden encontrar se pueden atribuir a que los experimentos de sincronización se llevaron a cabo de forma independiente y con diferentes tiempos de incubación en hidroxIUrea (24 horas en el estudio por inmunofluorescencia y 28 horas en el de citometría). Por otra parte, debido a la capacidad de la citometría de resolver las diferentes etapas del ciclo se pudo dilucidar que los estados 1F1K1N observados en inmunofluorescencia presentaban una distribución más compleja que la imaginada de antemano. Además, debido a la capacidad de resolución y el poder cuantitativo que ofrece podemos decir que la citometría sería la técnica preferencial para análisis del ciclo celular.

A partir de estos resultados se pasó a realizar un segundo experimento en el cual se realizaron dos modificaciones respecto al protocolo anterior. Primero se aumentó el tiempo de incubación a 32 horas esperando que de esta forma todo el cultivo cuente con el tiempo necesario para alcanzar el *checkpoint* G1/S y por lo tanto podamos obtener una mayor proporción de células en G1 a tiempo 0 horas. En segundo lugar, se recolectaron muestras en horas en torno a las 6 y 12 horas para definir con mayor precisión el momento en el cual la mayor parte de la población se encuentra efectivamente en las etapas S y G2 respectivamente. Para la fase S se colectaron dos horas posteriores a las 6 horas (7 y 8 horas post-lavado de la droga) dado a que se entiende que a este tiempo en la **Figura 5.5** se observa una fase S temprana debido a la mayor cantidad de células en G1 que en G2, que representan un 28 % y 17 % respectivamente. Aplicando el mismo razonamiento para la fase G2 se decidió tomar las horas 13 y 14 considerando que a las 12 horas en la **Figura 5.5** se observa una G2 temprana, acompañada de más parásitos en la etapa previa (26 % en fase S) que en la posterior (18 horas en la siguiente G1). Estas modificaciones se realizaron con la finalidad de obtener poblaciones lo más enriquecidas posibles en las diferentes etapas del ciclo.

En este segundo experimento se optó por mostrar directamente los resultados de la cuantificación de las poblaciones en lugar de los perfiles de Contenido de ADN; los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura 5.6**.



**Figura 5.6.** Distribución de las poblaciones sincronizadas en las fases del ciclo según el contenido de ADN determinado por citometría de flujo. Se sincronizaron cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* mediante incubación con hidroxiquina durante 32 horas, luego se lavó la droga del medio y los parásitos se resuspendieron en medio fresco. Se recogieron muestras a los tiempos indicado (T en horas) y se analizaron por citometría de flujo, determinando el porcentaje de células en la tres fases del ciclo por tinción con Ioduro de Propidio.

En primer lugar, para analizar la incidencia del tiempo de incubación en la sincronización de nuestros cultivos podemos comparar las poblaciones obtenidas en el tiempo 0 horas post-lavado de la hidroxiquina en los dos experimentos de citometría. Mientras que en el primer experimento se había alcanzado un 69 % de parásitos G1, en el segundo ese valor descendió hasta un 66 %, lo cual sugiere que el aumento del tiempo de incubación no mejoraría la eficiencia de la sincronización o incluso la empeoraría. Ahora si analizamos los valores de la población asincrónica, a partir de la cual se realizó la incubación en los dos experimentos, se observa que se obtuvieron distribuciones diferentes. En la población del segundo experimento se observa una disminución tanto para la fase S (de 20 % a 17 %) como para G2 (de 36 % a 31%) con un aumento concomitante de los parásitos en G1 (de 44 % a 52 %), siempre en función de lo observado en el primer experimento. Esta observación sugiere que de alguna forma el cultivo

utilizado en el segundo experimento podría haber estar proliferando más lentamente que el cultivo del primer experimento, a pesar de que se necesitaría de replicas experimentales que permitan aportar una significancia estadística a esta observación. Si se utiliza un cultivo que no está creciendo de forma óptima, es decir, no está en la fase exponencial de crecimiento, la eficiencia de la sincronización puede bajar, como se ve en la literatura (Galanti et al. 1994).

Respecto a la fase S, en este experimento se obtuvo un máximo de 58 % de parásitos en esta etapa a las 8 horas post-lavado de la droga (**Figura 5.6**), lo que representa solo un 2 % mayor a la cantidad obtenida a las 7 horas en el mismo experimento y un 3 % mayor a lo observado en el primer experimento a las 6 horas (**Figura 5.5**), sugiriendo nuevamente el leve efecto que aportó el aumento del tiempo de incubación con la droga a la eficiencia de la sincronización. La mayor diferencia entre las poblaciones a las 7 y a las 8 horas es la composición de G1 y G2 ; a las 7 horas G1 es la fase mayoritaria, por lo cual se hablaría de una población enriquecida en una fase S temprana, mientras que a las 8 horas G2 es la fase mayoritaria y hablaríamos de una fase S tardía. Con respecto al enriquecimiento de la fase G2, a las 13 horas post-lavado de la hidroxiurea se obtuvo un máximo de 64% de parásitos en esta etapa, lo que representa un 8% mayor a lo observado a las 12 horas en el primer experimento. Ahora, con respecto a las 12 y 14 horas del segundo experimento, el 64 % observado es respectivamente un 7 % y 2 % superior a ambas. Por otro lado, una evidencia que lleva a elegir a la población de las 13 horas por sobre la de las 14 horas es el aumento en un 4 % de los parásitos en G1 que se registra en ese lapso de tiempo, lo cual indica que estos corresponden al inicio del segundo ciclo, ya que hasta las 13 horas los valores de G1 solamente descendían. Esta observación puede sugerir la presencia de una sub-población que permanece constantemente en la etapa G1 indicando, ya sea: que estas células nunca pudieron superar el arresto en el punto de control G1/S; o que debido a estrés generado por la exposición a la droga desencadenan el pasaje a un estado de quiescencia replicativa; o nuevamente recurriendo a la observación del cultivo asincrónico, siempre estuvieron en este estado de quiescencia debido a que el cultivo no se encontraba en la fase exponencial de crecimiento. Cualquiera de estos escenarios podría también explicar los bajos porcentajes máximos obtenidos para las diferentes etapas del ciclo.

En suma, tanto los resultados del análisis por inmunofluorescencia como los resultados del análisis de citometría demuestran que mediante el método de exposición a hidroxiurea se logran poblaciones sincrónicas a partir de las cuales obtener muestras enriquecidas en las diferentes etapas del ciclo celular y que el método permite un análisis cuantitativo preciso. Un aspecto que sigue llamando la atención, es que al tiempo 0 luego de la liberación de la droga, continúa habiendo una alta proporción de la población (34%) fuera de G1/S, lo que indica que a pesar de incrementar el tiempo de incubación, continúa habiendo células que no se arrestaron. Esto es coherente con el uso de tanto de 28 como de 32 horas en vez el tiempo de duplicación observado, que fue de 39 horas. Lo cual sugeriría que debemos incubar mayor cantidad de tiempo el cultivo para lograr arrestar a toda la población. Estos análisis indican que aún no alcanzamos el nivel de purificación deseado (70%) para el proyecto a largo plazo. Un aspecto importante a mencionar es que existen otros programas de análisis de perfiles de contenido de ADN (ModFit LT™, Verity Software House) que realizan ajustes matemáticos a las curvas obtenidas, lo cual proporciona datos más precisos de la distribución de las poblaciones a lo largo de ciclo celular. Es posible que el análisis de los datos de nuestros experimentos con estas aproximaciones arroje mayores niveles de enriquecimiento de poblaciones a cada tiempo post-sincronización. Sin embargo los mismos son de uso restringido, por lo que no pudimos acceder a ellos.

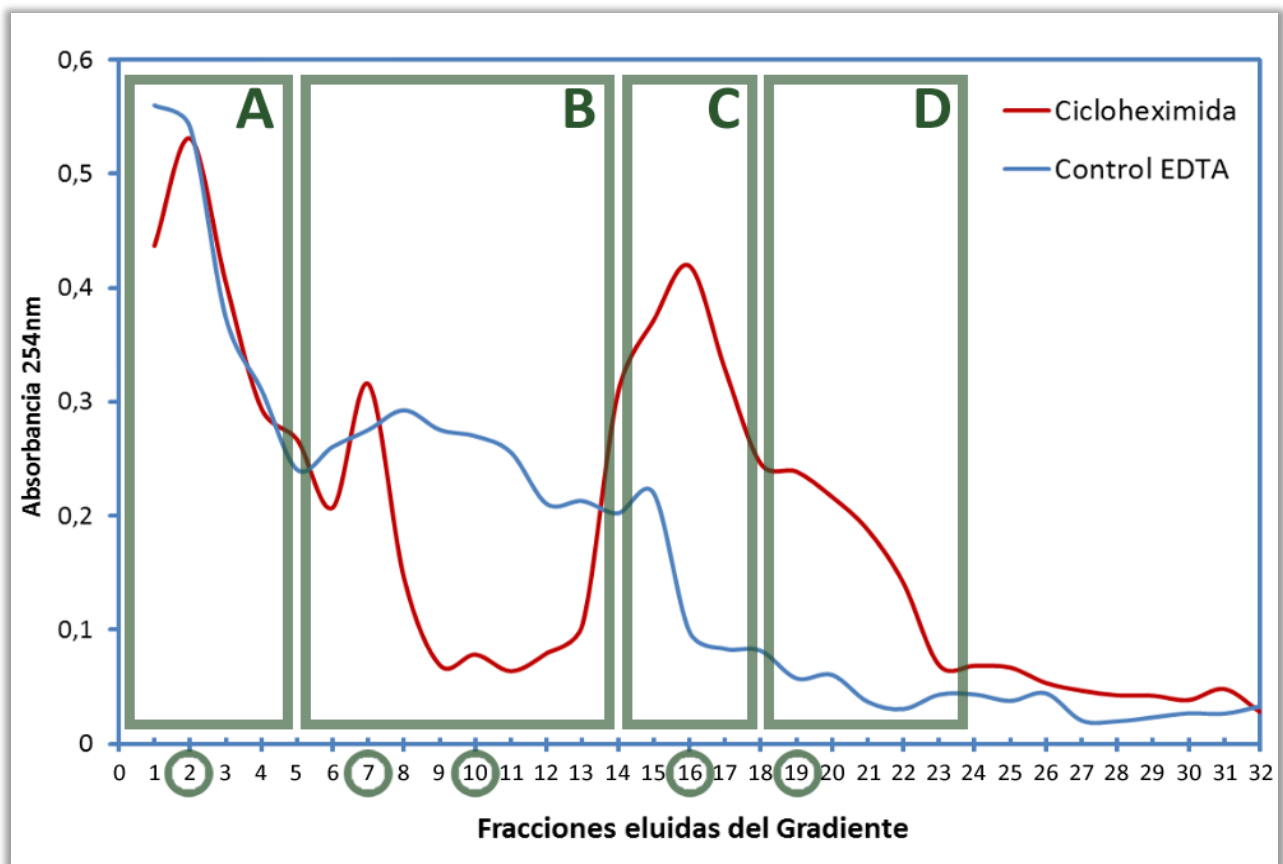
## 5.2 Obtención de la Fracción Polisomal

Se realizó un fraccionamiento subcelular para obtener la fracción polisomal a partir de extractos citosólicos de epimastigotas de *T. cruzi* siguiendo el protocolo descrito por Bretch y Parsons (Brecht et al. 1998) con modificaciones. Se cargó el extracto citosólico en un gradiente de 15%-60% de sacarosa y se ultracentrifugó. Las fracciones se colectaron a partir del extremo superior del tubo, el correspondiente a 15% Sacarosa, por lo cual las mismas están en un orden creciente de coeficientes de sedimentación. Se obtuvieron 32 fracciones de aproximadamente 100 µL. El experimento se controló utilizando un cultivo que no fue expuesto a cicloheximida sino a 0,5 M EDTA a efectos de desensamblar los

ribosomas. Para analizar la composición molecular de las fracciones eluidas de los gradientes se utilizó una aproximación espectrofotométrica, capaz de estimar cantidades relativas de proteínas y ácidos nucleicos, y una electroforética para determinar la identidad de los mismos.

### 5.2.1 Análisis espectrofotométrico de las fracciones eluidas

Para estudiar la cantidad relativa de ácidos nucleicos en cada fracción del gradiente de sacarosa, se midió la absorbancia de cada fracción a 254 nm. Los resultados obtenidos se observan en la **Figura 5.7**.



**Figura 5.7.** Análisis espectrofotométrico de las fracciones del gradiente de sacarosa. Para estudiar la presencia de ácidos nucleicos se analizó la absorbancia a 254nm de las fracciones obtenidas en la ultracentrifugación. Las fracciones se colectaron desde el extremo con concentración 15 % de sacarosa (Fracción 1) hacia el extremo correspondiente a 60 % de Sacarosa (Fracción 32) en el gradiente. Los perfiles en rojo y en azul corresponden a las muestras tratadas con Cicloheximida y con EDTA respectivamente. Se representan con las letras A-D cuatro regiones de diferente composición en ácidos nucleicos. Se destacan en un círculo verde las fracciones seleccionadas para el estudio de los ARNs por electroforesis. Se muestra un experimento representativo de tres.



Los perfiles obtenidos en estos experimentos usualmente constan de un pico inicial de absorción correspondiente a proteínas solubles y ácidos nucleicos de bajo peso, seguido de varios picos conspicuos que están compuestos de diferentes complejos macromoleculares (**Figura 5.7**). La identidad de cada pico, es decir, la composición proteica en cada posición del gradiente de sacarosa, varía de acuerdo al organismo y a los parámetros de la centrifugación. Dentro de estos últimos, son de especial relevancia la velocidad y el tiempo de centrifugación, así como las dimensiones del gradiente. Dado que se disponía de un único rotor de balanceo de alta velocidad, solamente se pudieron optimizar las otras variables. Por limitaciones del tamaño de este trabajo se decidió exponer el último experimento de cuatro realizados, cuyos resultados se muestran en la **Figura 5.7**. En la misma se grafica la absorción a 254 nm (a efectos de analizar la presencia de ácidos nucleicos evitando la interferencia debida a la presencia de proteínas en las muestras), en función de cada fracción del gradiente para el experimento con CHM, donde se espera obtener ribosomas ensamblados, y el control en EDTA, donde se espera que se hayan desensamblado estas estructuras y por lo tanto no hay picos de absorción en las zonas del gradiente correspondientes a la presencia de ribosomas.

Estas curvas se subdividieron en cuatro regiones de interés particular, las cuales se representan en la **Figura 5.7** con letras de la **A** a la **D**, a efectos de facilitar la discusión. En la región **A** se encuentran las moléculas y complejos moleculares de bajo peso molecular debido a que corresponde a los coeficientes de sedimentación menores del gradiente. Con respecto al contenido en ARN de esta región, aquí se espera que sedimenten ARNs pequeños, como los ARN de transferencia o ARNm no asociados a ribosomas, es así que se define a esta zona como libre de ARN ribosomal (Nardelli et al. 2007). Los altos valores de absorbancia obtenidos, tanto para CHX como para EDTA, se pueden explicar por la presencia de estos ARN y por la alta concentración de proteínas esperada en esta región que genera una absorbancia contaminante a 254nm (a pesar de que el pico máximo de absorbancia proteica está en 280 nm la ladera de curva comprende la zona de 254 nm, contribuyendo así a la zona de absorción preferencial de los ácidos nucleicos). La región **B** muestra diferencias entre el ensayo con cicloheximida y el de EDTA, ya que es donde se espera que sedimenten las subunidades ribosomales 40S y 60S (Nardelli et al. 2007). De esta forma, es lógico esperar absorbancias mayores para el ensayo con EDTA ya que el

agregado de este agente causa el desensamblaje del ribosoma, mientras que para el experimento de cicloheximida se espera que las subunidades se encuentren formando parte de ribosomas ensamblados sobre ARNm, y por lo tanto deben aparecer en zonas del gradiente correspondientes a coeficientes de sedimentación mayores. El ribosoma como monómero (monosoma), ya sea asociado a algún ARNm o no, se espera que sedimente en la región **C**, dado que posee un coeficiente de sedimentación levemente mayor que las subunidades libres. Por lo tanto, es esperable encontrar un pico de mayor intensidad para el ensayo de cicloheximida comparado al control con EDTA, tal como se observa en el experimento de la **Figura 5.7**. Por último, al alcanzar coeficientes de sedimentación mayores a los del ribosoma encontramos la región **D**, denomina también fracción polisomal, en donde se anticipa que sedimenten los ARNm asociados a poliribosomas. En este caso también se observan valores de absorbancia mayores para el ensayo de cicloheximida en comparación con el control con EDTA, en acuerdo con lo descrito en la literatura. Sin embargo, en esta región se suele observar un patrón regular de picos gradualmente más pequeños, en el que el primer pico representa un ARNm asociado a dos ribosomas, el siguiente un ARNm asociado a tres ribosomas y aumentando el número de ribosomas sucesivamente hacia valores de coeficiente de sedimentación mayores (Nardelli et al. 2007). En nuestros experimentos, la región donde sedimentan los polisomas se observa como una meseta sin picos definidos, por lo que se necesita otro tipo de evidencia experimental que confirme la naturaleza de estas fracciones. Nosotros adjudicamos este problema a las dimensiones pequeñas del gradiente que utilizamos, que lamentablemente fue el único disponible en Montevideo. Sin embargo, debido a que en nuestro proyecto estos gradientes de sacarosa solo se utilizarán para verificar la calidad de la separación de los ribosomas ensamblados contra los complejos proteicos más pequeños en un colchón de sacarosa, la resolución de este gradiente es igual adecuada para nuestros propósitos.

Otro aspecto de estas curvas, que difiere de lo reportado habitualmente, es la absorbancia que se observa en el control con EDTA en la regiones correspondientes al monosoma y a los polisomas. Esta se puede explicar por la eficiencia relativamente baja del agente quelante EDTA para desensamblar por completo este tipo de complejos macromoleculares. En el futuro, se podría eliminar por completo estos complejos

utilizando otro tipo de agentes desensamblantes de estas estructuras. La Puromicina o la Pactamicina son comúnmente utilizados como controles negativos más específicos en este tipo de ensayos (Kramer et al. 2008; Smith et al. 2009; Nardelli et al. 2007; Djikeng et al. 2003), pero son de mayor costo que el EDTA, razón por la cual se decidió utilizar EDTA en esta primer aproximación experimental.

En resumen, los perfiles de absorbancia obtenidos en este experimento se asemejan a los reportados en la literatura para tripanosomátidos (Brecht et al. 1998; Djikeng et al. 2003; Nardelli et al. 2007; Smith et al. 2009) y también para otros organismos (Dinkova et al. 2004; Fletcher et al. 2000). La resolución de los perfiles podría incrementarse de disponerse de un roto de balanceo con tubos de mayor volumen, como por ejemplo los rotores SW.40 o SW.41 que llevan tubos con una capacidad de entre 12 y 15 mL (Brecht et al. 1998; Nardelli et al. 2007; Smith et al. 2009), y que son los recomendados en estos ensayos, en conjunto con agentes desensamblantes de ribosomas más efectivos.

### 5.2.2 Visualización del Contenido de ARN de las fracciones

Un método complementario para estudiar la composición de las fracciones eluidas del gradiente de sacarosa, es el análisis de la composición de ARN de las mismas. Con este objetivo, se seleccionaron fracciones representativas de las cuatro regiones estudiadas y se aisló el ARN presente en las mismas, para luego visualizarlo en un gel de agarosa. Se seleccionó la fracción **2** para el estudio de la región libre de ARN ribosomal (**A**), las fracciones **7** y **10** para la región de las subunidades ribosomales (**B**), la fracción **16** que se corresponde al pico máximo de absorbancia de la región del monosoma (**C**), y ,por último, la fracción **19** que representa el primer pico de absorbancia de la región de polisomas (**D**). La extracción se realizó con TRIzol® (Invitrogen™) y al ARN obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de microvolúmenes. Los resultados de la extracción de ARN se resumen en la **tabla 5.1**.

El ARN aislado mostró una relación Absorbancia 260nm/280nm entre 1,86 y 2,04, por lo que la pureza con respecto a la contaminación proteica de las fracciones está en el rango aceptable de la técnica. Considerando que no es necesario alcanzar un alto grado de

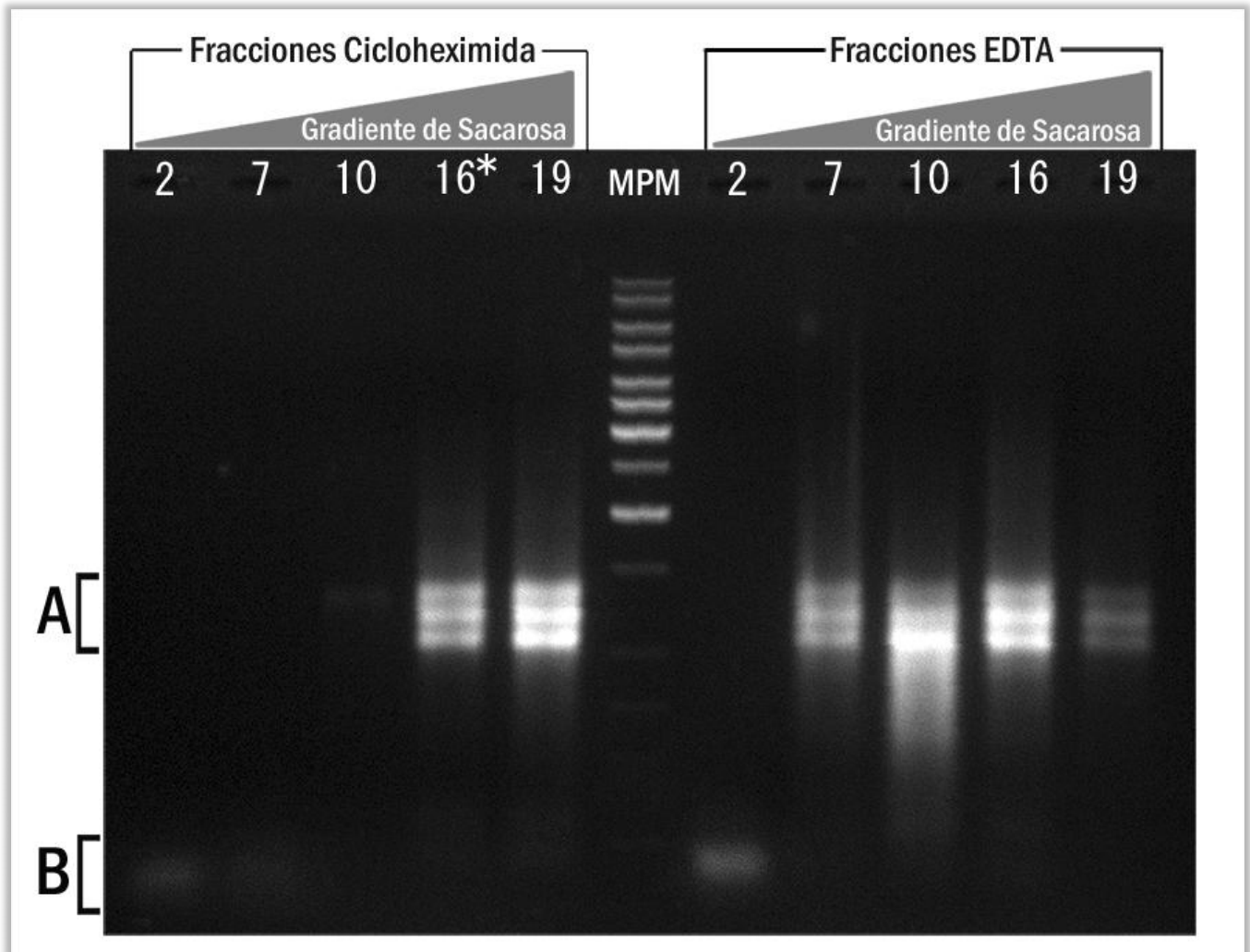
pureza para pasar a la visualización en gel de los ARNs, se consideró aceptable el valor alcanzado. Por otro lado, el resultado de concentración de ARN obtenida está acorde a la interpretación de los perfiles de absorbancia observados en la **Figura 5.7** que realizamos previamente. Nótese que la fracción 16, que es aquella en la que se espera mayor cantidad de ribosomas en el experimento con cicloheximida (curva roja de la Figura 4.6) es la fracción en la que se aísla más ARN total. Dado que el ARN ribosomal representa la fracción mayoritaria del ARN de una célula (aproximadamente 90%), la fracción en la que sedimenten más ribosomas debe ser la que muestre la mayor concentración de ARN. Paralelamente, la fracción 16 en el experimento control con EDTA, que no muestra un pico de absorción a 254nm en la fracción original muestra una cantidad mucho menor de ARN luego de la extracción de ARN. Esto sugiere que es el ARN ribosomal el que está contribuyendo mayormente a la medida.

**Tabla 5.1** Concentración de ARN en las fracciones seleccionadas para analizar electroforéticamente.

	Fracción	Relación (Abs <sub>260nm</sub> /A <sub>280nm</sub> )	[ARN] (ng/ μL)
CHX	2	1,87	83,71
	7	1,77	73,4
	10	1,86	20,6
	16	2,04	1701,5
	19	1,99	392,6
EDTA	2	1,94	148,1
	7	1,96	169,5
	10	2,01	293,0
	16	2,02	22,5
	19	1,95	151,7

Finalmente con el objetivo de visualizar que tipos de ARNs están presentes en las diferentes fracciones, y así confirmar su identidad de ARN ribosomal, se realizó una electroforesis en gel de agarosa en condiciones no desnaturizantes (**Figura 5.8**). Se sembró en el gel el mismo volumen de cada fracción, independientemente de la

concentración de ARN de las mismas, con la intención de analizar en el gel las cantidades relativas de cada tipo de ARN en las distintas fracciones.



**Figura 4.7. Análisis de la población de ARNs en las fracciones obtenidas.** Se realizó un electroforésis en gel de Agarosa al 1% en condiciones no desnaturizantes de las fracciones seleccionadas. Se cargaron 16  $\mu$ L de cada fracción con 4  $\mu$ L buffer de carga. A la izquierda del marcador de peso Molecular (MPM) se cargaron las muestras correspondientes al ensayo con CHX y a la derecha el control con EDTA. Los números en cada carril representan la fracción que fue sembrada en el mismo, el \* hace alusión a que la fracción 16 del ensayo con CHX se le realizó una dilución al cuarto para ser cargada en el gel.

En primer lugar, las tres bandas que se señalan con la **A** se corresponden a los diferentes ARN ribosomales en *T. cruzi*, para los cuales está reportado este particular perfil de migración (Nardelli et al. 2007). Luego, en la región señalada con la letra **B**, la banda de menor intensidad, que se puede apreciar claramente en la fracción 2 del ensayo con

EDTA, se corresponde a ARNs pequeños, como ARNs de transferencia, fragmentos de ARNm y ARNs pequeños nucleares.

Con respecto a las fracciones del experimento con Cicloheximida, solamente se aprecia la presencia de ARNs ribosomales en las fracciones 16 y 19, indicando que estas fracciones efectivamente representan a la región donde sedimentan los monosomas y los ribosomas respectivamente, confirmando lo sugerido en el perfil de absorbancias (**Figura 5.7**). Por otro lado, la presencia de una única banda de baja intensidad en la región para los ARNs pequeños en la fracción 2 confirma la naturaleza de esta como región libre de ARN ribosomal. Por último, no fuimos capaces de detectar ARN ribosomal en las fracciones 7 y 10 (correspondientes a las subunidades), lo cual nos está hablando de que mediante el tratamiento con cicloheximida fuimos capaces de mantener a los ribosomas ensamblados, ya sea como monosomas o polisomas.

Si analizamos el experimento control con EDTA, la presencia de únicamente ARNs pequeños en la fracción 2 nuevamente confirma la identidad de la región libre de ribosomas del gradiente. Por otro lado, en este experimento si se pudo observar ARN ribosomal en las fracciones 7 y 10, acorde con el desensamblaje del ribosoma en sus subunidades causado por el agregado del EDTA. Por lo tanto, la ausencia de señal en las fracciones 7 y 10 para ARN ribosomal en el experimento con Cicloheximida, y la presencia de esta señal en las mismas fracciones del experimento con EDTA, confirman que es en esta región del gradiente donde sedimentan las subunidades ribosomales libres. En este experimento también se detecta la presencia de ARN ribosomal en las fracciones 16 y 19, correspondientes a la región del monosoma y de los polisomas respectivamente, lo cual concuerda con la absorbancia remanente en el perfil espectrofotométrico (**Figura 5.6**) que habíamos atribuido a la incapacidad del EDTA de desensamblar por completo a los ribosomas. Sin embargo, se puede decir que por lo menos un 50 % del ARN ribosomal total se distribuyó hacia la región de las subunidades, lo cual es más que suficiente para confirmar que lo que se observa en las fracciones 16 y 19 para ambos experimentos corresponde a la región donde el ribosoma todavía está ensamblado. Por último, recordando que la fracción 16 de la cicloheximida fue diluida antes de ser cargada en el gel, se puede decir que probablemente la mayor parte del ARN ribosomal se encuentre

formando parte de complejos monoméricos en lugar de participar en agregados de polisomas.

En suma, considerando los fines del proyecto global, el nivel de pureza alcanzado en el aislamiento de la fracción polisomal es más que suficiente, ya que el objetivo del experimento es separar los ARNm que están siendo activamente traducidos de aquellos que no. Por lo tanto, se podría recolectar las fracciones a partir de la 16 en adelante para los ARNm en el proceso de traducción y se espera que la contaminación por ARNm libres en esta zona del gradiente sea mínima, ya que estos últimos sedimentan al principio de gradiente, o en el peor de los casos en las fracciones de las subunidades para ARNm de gran tamaño. Finalmente, a partir de los resultados obtenidos concluimos que fuimos capaces de aislar la fracción de ARNm asociados a ribosomas a partir de cultivos asincrónicos de epimastigotas de *T. cruzi*.

## 6 | CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Con respecto los objetivos específicos de esta tesina se puede decir que los resultados obtenidos constituyen un avance significativo en la puesta a punto de las metodologías descritas. Más específicamente, en lo referido a la obtención de poblaciones de parásitos enriquecidas en las distintas etapas del ciclo celular de la cepa Esmeraldo, fuimos capaces de obtener poblaciones sincrónicas mediante el método de la Hidroxiurea. Además, se puso a punto por primera vez en nuestro grupo, el análisis citométrico del ciclo celular en *T. cruzi*. Es importante destacar que este tipo de análisis no es trivial en los tripanosomátidos debido a la complejidad de su morfología y a la atípica distribución de su ADN. En adelante contamos entonces con una herramienta de análisis sencilla y precisa, que podrá ser útil para la investigación en *T. cruzi* por otros investigadores. Sin embargo, las poblaciones obtenidas no alcanzaron el nivel de pureza que nos habíamos propuesto inicialmente (70 %), ya que obtuvimos un 66 % para la fase G1, un 58 % para fase S y un 64 % para G2, valores que igualmente no están tan alejados de nuestra meta. Es posible que un cambio en el método de análisis de los datos, sumado a ajustes en el protocolo permita alcanzar el umbral deseado. Entre ellos proponemos el incremento del tiempo de incubación con la droga, el ensayo de diferentes concentraciones de la droga, y la utilización de hambruna previa a la incubación con hidroxiurea, tal como otros han reportado previamente (Galanti et al. 1994).

Por otro parte, se alcanzó el segundo objetivo planteado en esta tesina, dado que logramos poner a punto un protocolo de aislamiento de la fracción polisomal para extractos celulares de cultivos de *Trypanosoma cruzi*. La resolución obtenida en el gradiente es suficiente para poder discriminar una fracción con ribosomas ensamblados y asociados a ARNs mensajeros de una fracción conteniendo ribosomas desensamblados y ARNm libres.

En lo que respecta a las perspectivas inmediatas de este trabajo, en primer lugar cabe aclarar que queda trabajo a realizar antes de generar las bibliotecas de secuenciación. Está planeado realizar análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa con el ARN



extraído de las distintas etapas del ciclo celular, para un conjunto de genes presuntamente regulados y no regulados en el ciclo celular. Este trabajo se realizará a modo de control de calidad, tanto de las muestras obtenidas como del ARN que se extraiga de las mismas. Posteriormente, se necesita realizar los experimentos de sincronización y de aislamiento del polisomas en serie. Esto nos llevara a obtener ARNm asociado a polisomas para las distintas fases del ciclo, el cual también se va a analizar por PCR cuantitativa en este caso para genes asociados al ciclo y genes que tengan una regulación por movilización polisomal demostrada. Otro aspecto a poner a punto sería la utilización de la enzima que digiere el ARNm que no está protegido por el ribosoma, y de esta forma genera las huellas polisomales de aproximadamente 28 nucleótidos. Por último, quedaría realizar el escalado del experimento a las cantidades necesarias para generar material suficiente para la secuenciación, para lo cual se estima que deberíamos partir de una cantidad en el orden de  $10^9$  parásitos.

Finalmente, como última etapa del proyecto mayor, a partir de los ARNs específicos de los tres estadios del ciclo celular, con las poblaciones de ARNs totales y polisomales separadas, se generarán bibliotecas para la secuenciación masiva. Los resultados de la secuenciación serán luego analizados bioinformáticamente para determinar qué genes son modulados a nivel de su estabilidad o de su traductibilidad durante el ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*. Asimismo se buscarán la existencia de motivos en el ARN que puedan gobernar sistemas post-transcripcionales de regulones del nivel de mensajeros o de proteínas.

## BIBLIOGRAFÍA |

- Agabian N., **1990**. "Trans splicing of nuclear pre-mRNAs." *Cell* 61(7):1157-60.
- Andrews B., Measday V., **1998**. "The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea." *Trends in genetics : TIG* 14(2):66-72.
- Archer S., Stuart K, Inchaustegui D., Queiroz R., Clayton C., **2011**. "The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*." *PLoS One* 6(3):e18425.
- Archer S., Luu V., Queiroz R., Brems S, Clayton C., **2009**. "Trypanosoma brucei PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle." *PLoS pathogens* 5(8):e1000565.
- Aslett M., Aurrecochea C., Berriman M., *et al.*, **2010**. "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." *Nucleic acids research* 38(Database issue):D457-62.
- Ávila, A. Dallagiovanna B., Yamada-Ogatta S., Monteiro-Góes V., Fragoso S., Krieger M., Goldenberg S., **2003**. "Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." *Genetics and Molecular Research* 2(1):159-168.
- Baliga B., Pronczuk A., Munro H., **1969**. "Mechanism of Cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from Rat Liver." *The Journal of Biological Chemistry* 244(16):4480-4489.
- Bangs J., Crain P., Hashizume T., McCloskey J., Boothroyd J., **1992**. "Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides." *J. Biol. Chem.* 267(14):9805-9815.
- Berriman M., Ghedin E., Hertz-Fowler C., *et al.*, **2005**. "The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*." *Science* 309(5733):416-22.
- Branche C., Ochaya S., Aslund., Andersson B., **2006**. "Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and biochemical parasitology* 147(1):30-8.
- Brecht M., Parsons M., **1998**. "Changes in polysome profiles accompany trypanosome development." *Molecular and biochemical parasitology* 97(1-2):189-98.
- Bybee A., Thomas N., **1991**. "Cell cycle regulation." *Blood reviews* 5(3):177-92.
- Castellani O., Ribeiro L., Fernandes J., **1967**. "Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture." *The Journal of protozoology* 14(3):447-51.
- 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* (1):159-219.
- Choi J., El-Sayed N., **2011**. "Functional Genomics of Trypanosomatids." *Parasite immunology*.
- Clayton C., **2002**. "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." *EMBO Journal* 21(8):1881-1888.
- Coura J., Borges-Pereira J., **2010**. "Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review." *Acta tropica* 115(1-2):5-13.
- Crowther G., Shanmugam D., Carmona, S., *et al.* **2010**. "Identification of attractive drug targets in neglected-disease pathogens using an in silico approach." *PLoS neglected tropical diseases* 4(8):e804.
- da Cunha J., Nakayasu E., Elias M., *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(1):75-86.

- da Cunha J., Nakayasu E., de Almeida I., Schenkman S., **2006**. "Post-translational modifications of Trypanosoma cruzi histone H4." *Molecular and biochemical parasitology* 150(2):268-77.
- De Gaudenzi, Javier G, Iván D'Orso, and Alberto 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(21):18884-94.
- De Lange T., Michels P., Veerman H., Cornelissen A., Borst P., **1984**. "Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence." *Nucleic acids research* 12(9):3777-90.
- De Souza, W., **2002**. "Basic Cell Biology of Trypanosoma cruzi." *Current pharmaceutical design* 8(4):269-285.
- Davis P., Ho A., Dowdy S., **2001**. "Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells." *BioTechniques* 30(6):1322-6, 1328, 1330-1.
- Dinkova T., Keiper B., Korneeva N., Aamodt E., Rhoads R., **2004**. "Translation of a Small Subset of Caenorhabditis elegans mRNAs Is Dependent on a Specific Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Isoform." *Molecular and Cellular Biology* 25(1):100-113.
- Djikeng A., Shi H., Tschudi C., Shuiyuan S., Ullu E., **2003**. "An siRNA ribonucleoprotein is found associated with polyribosomes in Trypanosoma brucei." *Rna* 9(7):802-808.
- Duhagon M, Pastro L, Sotelo-Silveira J, Pérez-Díaz L, Maugeri D, Nardelli S, Schenkman S, Williams N, Dallagiovanna B, Garat B., **2009**. "The Trypanosoma cruzi nucleic acid binding protein Tc38 presents changes in the intramitochondrial distribution during the cell cycle." *BMC microbiology* 9:34.
- Dvorak J., **1993**. "Analysis of the DNA of parasitic protozoa by flow cytometry." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 21:191-204.
- El-Sayed N., Myler P., Bartholomeu D., et al. **2005a**. "The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease." *Science* 309(5733):409-15.
- El-Sayed N., Myler P., Blandin G., et al. **2005b**. "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." *Science* 309(5733):404-9.
- Elias M., da Cunha J., de Faria F., Mortara R., Freymüller Edna., Schenkman S., **2007**. "Morphological events during the Trypanosoma cruzi cell cycle." *Protist* 158(2):147-57.
- Fletcher J., Copeland P., Driscoll D., **2000**. "Polysome distribution of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA: evidence for a block in elongation at the UGA/selenocysteine codon." *RNA (New York, N.Y.)* 6(11):1573-84.
- Franzén O., Arner E., Ferella M., et al., **2011**. "The Short Non-Coding Transcriptome of the Protozoan Parasite Trypanosoma cruzi." *PLoS neglected tropical diseases* 5(8):e1283.
- Galanti N., Dvorak J., Grenet J., McDaniel J., **1994**. "Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida." *Experimental cell research* 214(1):225-230.
- Gentil L., Cordero E., do Carmo M., dos Santos M., da Silveira J., **2009**. "Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in Trypanosoma cruzi." *Acta tropica* 109(2):152-8.
- Gilinger G., Bellofatto V., **2001**. "Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms." *Nucleic acids research* 29(7):1556-64.
- Goldenberg S., Ávila A., **2011**. "Aspects of Trypanosoma cruzi stage differentiation". *Advances in parasitology* 1st ed. Elsevier Ltd. 75, 285-305
- Grant K., **2008**. "Targeting the cell cycle in the pursuit of novel chemotherapies against parasitic protozoa." *Current pharmaceutical design* 14(9):917-24.

- Gray J., Darzynkiewicz Z., eds. **1987**. *Techniques in Cell Cycle Analysis*. The Humana Press Inc.
- Guedes P., Silva G., Gutierrez F., Silva J., **2011**. "Current status of Chagas disease chemotherapy." *Expert review of anti-infective therapy* 9(5):609-20.
- Guhl F., **2007**. "Reporte sobre la enfermedad de Chagas." *World Health Organization*.
- Gutiyama L., da Cunha J., Schenkman S., **2008**. "Histone H1 of *Trypanosoma cruzi* is concentrated in the nucleolus region and disperses upon phosphorylation during progression to mitosis." *Eukaryotic cell* 7(4):560-8.
- Gómez E., Kornblihtt A., Téllez-Iñón M., **1998**. "Cloning of a cdc2-related protein kinase from *Trypanosoma cruzi* that interacts with mammalian cyclins." *Molecular and biochemical parasitology* 91(2):337-51.
- Gómez E., Santori M., Laría S., Engel J., Swindle J., Eisen H., Szankasi P., Téllez-Iñón M., **2001**. "Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins." *Molecular and biochemical parasitology* 113(1):97-108.
- Hammarton T., **2007**. "Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*." *Molecular and biochemical parasitology* 153(1):1-8.
- Hammarton T., Clark J., Douglas F., Boshart M., Mottram J., **2003a**. "Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin." *The Journal of biological chemistry* 278(25):22877-86.
- Hammarton T., Mottram J., Doerig C., **2003b**. "The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation." *Progress in cell cycle research* 5:91-101.
- Ivens A., Peacock C., Worthey E., et al. **2005**. "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." *Science* 309(5733):436-42.
- Ingolia N., Ghaemmaghami S., Newman J., Weissman J., **2009**. "Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling". *Science* 324(5924), 218-23.
- Jensen B., Sivam D., Kifer T., Myler P., Parsons M., **2009**. "Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*." *BMC genomics* 10:482.
- Kabani S., Fenn K., Ross A., Ivens A., Smith T., Ghazal P., Matthews K., **2009**. "Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*." *BMC genomics* 10:427.
- Kolev N., Franklin J., Carmi S., et al., **2010**. "The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution." *PLoS pathogens* 6(9).
- Koç A., Wheeler L, Mathews C., Merrill G., **2004**. "Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools". *The Journal of biological chemistry*, 279(1), 223-30.
- Kramer S., Queiroz R., Ellis L., Webb H., Hoheisel J., Clayton C., Carrington M., **2008**. "Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169." *Journal of cell science* 121(Pt 18):3002-14.
- Krieger M., Ávila A., Ogatta S., Plazanet-Menut C., Goldenberg S., **1999**. "Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1:165-8.
- Krishan, A. 1975. "Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining." *The Journal of cell biology* 66(1):188-93.
- Le Breton, Magali, Patrick Cormier, Robert Bellé, Odile Mulner-Lorillon, and Julia Morales. 2005. "Translational control during mitosis." *Biochimie* 87(9-10):805-11.

- LeBowitz J., Smith H., Rusche L., Beverley S., **1993**. "Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*." *Genes & development* 7(6):996-1007.
- Lewis M., Llewellyn M., Gaunt M., Yeo M., Carrasco H., Miles M., **2009**. "Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids." *International journal for parasitology* 39(12):1305–1317.
- Marques Porto R., Amino R., Elias M., Faria M., Schenkman S., **2002**. "Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and biochemical parasitology* 119(2):265-71.
- Martínez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J., Florencio-Martínez L., Manning-Cela R., Figueroa-Angulo E., **2010**. "Gene Expression in Trypanosomatid Parasites." *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010:525241.
- McKean P., **2003**. "Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*." *Current opinion in microbiology* 6(6):600-7.
- McKinney J., Heintz N., **1991**. "Transcriptional regulation in the eukaryotic cell cycle." *Trends in biochemical sciences* 16(11):430-5.
- Miles M., Toye P., Oswald S., Godfrey D., **1977**. "The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71(3):217-25.
- Minning T., Weatherly D., Atwood J., Orlando R., Tarleton R., **2009**. "The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*." *BMC genomics* 10:370.
- Morgan D., **1995**. "Principles of CDK regulation." *Nature* 374(6518):131-4.
- Murray A., **2004**. "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* 116(2):221-234.
- Myler P., **2008**. "Searching the Tritryp genomes for drug targets." *Advances in experimental medicine and biology* 625:133-40.
- Nardelli S., Avila A., Freund A., *et al.* **2007**. "Small-Subunit rRNA Processome Proteins Are Translationally Regulated during Differentiation of *Trypanosoma cruzi*." *Eukaryotic Cell* 6(2):337-345.
- Nardelli S., da Cunha J., Motta M., Schenkman S., **2009**. "Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage." *Chromosoma* 118(4):487-99.
- Naula C., Parsons M., Mottram J., **2005**. "Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*." *Biochimica et biophysica acta* 1754(1-2):151-9.
- Palenchar J., Bellofatto V., **2006**. "Gene transcription in trypanosomes." *Molecular and biochemical parasitology* 146(2):135-41.
- Perry K., Watkins K., Agabian N., **1987**. "Trypanosome mRNAs Have Unusual "Cap 4" Structures Acquired by Addition of a Spliced Leader." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(23):8190-8194.
- Pines J., **1995**. "Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view." *The Biochemical journal* 308 (Pt 3):697-711.
- Ploubidou A., Robinson D., Docherty R., Ogbadoyi E., Gull K., **1999**. "Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis." *Journal of cell science* 112(2):4641-50.
- Podlipaev S., **2001**. "The more insect trypanosomatids under study; the more diverse Trypanosomatidae appears." *International journal for parasitology*.

- Porcile P., Santos M., Souza R., *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.
- Recinos, R., Kirchhoff L., Donelson J., **2001**. "Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and biochemical parasitology* 113(2):215-22.
- Roth V., **2006**. <http://www.doubling-time.com/compute.php>
- Rustici G., Mata J., Kivinen K., *et al.* **2004**. "Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle." *Nature genetics* 36(8):809-17.
- Sabaj, V., Aslund L., Pettersson U., Galanti N., **2001**. "Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*." *Journal of cellular biochemistry* 80(4):617-24.
- Santori M., Laría S., Gómez E., Espinosa I., Galanti N., Téllez-Iñón M., **2002**. "Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*." *Molecular and biochemical parasitology* 121(2):225-32.
- 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(17):5695-5699.
- Schafer K., **1998**. "The cell cycle: a review." *Veterinary pathology* 35(6):461-78.
- Shaw J., Feagin J., Stuart K., Simpson L., **1988**. "Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons." *Cell* 53(3):401-11.
- Siegel T., Hekstra D., Wang X., Dewell S., Cross G., **2010**. "Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites." *Nucleic acids research* 38(15):4946-57.
- Smith T., Vasileva N., Gluenz E., *et al.* **2009**. "Blocking variant surface glycoprotein synthesis in *Trypanosoma brucei* triggers a general arrest in translation initiation." *PloS one* 4(10):e7532.
- Solari A., **1995**. "Mitosis and genome partition in trypanosomes." *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopía Electronica ... et. al* 19(2):65-84.
- Stuart K., Brun R., Croft S., Fairlamb A., Gürtler R., McKerrow J., Reed S., Tarleton R., **2008**. "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases." *The Journal of clinical investigation* 118(4):1301.
- Tyler K., Engman D., **2001**. "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." *International journal for parasitology* 31(5-6):472-81.
- Ullu E., Tschudi C., Chakraborty T., **2004**. "RNA interference in protozoan parasites." *Cellular microbiology* 6(6):509-19.
- Urbina J., **2010**. "Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches." *Acta tropica* 115(1-2):55-68.
- Vanhamme L., Pays E., **1995**. "Control of gene expression in trypanosomes." *Microbiological reviews* 59(2):223-40.
- Walker G., **1999**. "Synchronization of yeast cell populations." *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology* 21(2-3):87-93.
- Wang, Z., Gerstein M., Snyder M., **2009**. "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nature reviews. Genetics* 10(1):57-63.
- Weatherly D., Boehlke C., Tarleton R., **2009**. "Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome." *BMC genomics* 10:255.

- Weisstein E., **1999**. "Least Squares Fitting--Exponential." *From MathWorld--A Wolfram Web Resource*. <http://mathworld.wolfram.com/LeastSquaresFittingExponential.html>.
- World Health Organization. **2004**. "Mortality and Burden of Disease Estimates for WHO Member States in 2004." Retrieved ([http://www.who.int/entity/healthinfo/global\\_burden\\_disease/gbddeathdalycountryestimates2004.xls](http://www.who.int/entity/healthinfo/global_burden_disease/gbddeathdalycountryestimates2004.xls)).
- Zingales B., Andrade S., Briones M., *et al.* **2009**. "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(7):1051-4.

## AGRADECIMIENTOS |

En primer lugar indudablemente está la familia. Tanto, mi madre y mis hermanos como Alvarito que siempre me dieron luz verde en cualquier camino que decidiera tomar y me apoyaron a transitar por el mismo. También mi padre y mi hermana que supieron también brindarme apoyo desde el principio de este camino. Por último, también especial énfasis en mis abuelas, que ambas dos me facilitaron herramientas fundamentales para desarrollarme y además supieron “malcriarme” (en el mejor sentido de la palabra) siempre que fuese necesario.

Especialmente a María Ana con quien tengo y seguiré teniendo el placer de trabajar. Para mí fue un honor haber trabajado bajo su tutoría a partir de la cual me nutrí tanto académicamente como a nivel humano. Como ya le he dicho varias veces en estos días, infinitas gracias, el esfuerzo dedicado por su parte será siempre tenido en cuenta.

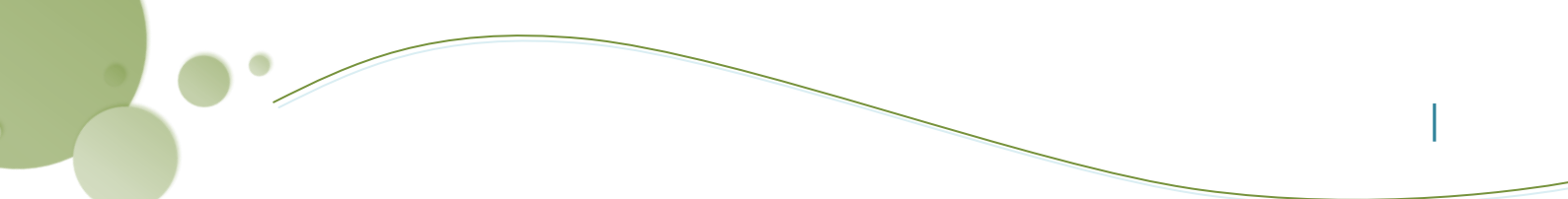
Luego a la Facultad por brindar el ambiente necesario para que surgieran amistades que fueron fundamentales a lo largo de estos arduos pero muy disfrutables años de estudio. En estricto orden azaroso (realmente saqué papeles de una bolsa) Flopy, Mauri, Nadita, LuRo y FloTo.

Por otra parte, el genial grupo de compañeros de laboratorio del LIM que, a pesar de que sea una “frase repetida” (del francés, *cliché*), hacen que sea placentero trabajar a su lado. En este caso, en orden no-alfabético, Bea, Pablito, Leti, Lu P., Lu G., Lore, Caro, y por último, pero no menos genial Rafita.

Importantes baluartes si los habrá, el Dr. José Sotelo Silveira y pronto Lic. Guillermo Eastman con los cuales compartí muy buenas horas de trabajo y también otras horas.

También debo reconocer la compañía de los nuevos compañeros del Departamento de Genética de Facultad de Medicina, que en particular me supieron aguantar en estos últimos meses de escritura. Asimismo al Departamento de Genética en general, que participó activamente en el desarrollo de este trabajo.





A la Dra. Lucía Piacenza, al Dr. Gonzalo Peluffo y a las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas en el Departamento de Bioquímica de Facultad de Medicina que permitieron la puesta a punto de la metodología de la citometría de flujo para los parásitos.

Para el otro lado del charco, a la Dra. Mariana Potenza del Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular INGEBI-CONICET de la Universidad de Buenos Aires que nos dio una importante mano respecto a las sincronizaciones de los parásitos y también al análisis citométrico de estas muestras.

El apoyo de la agencia financiadora ANII que participa en este proyecto mediante la beca de iniciación a la investigación INI\_X\_2010\_2\_2964.

Por último, nuevamente entrando en el terreno de la frases hechas y dichas pero no menos verdaderas, gracias Yan por ser mi cable a tierra a lo largo de toda la carrera. Simplemente la razón por la cual uno es capaz de disfrutar la vida, gracias por estar ahí.