

---

Tesis de Doctorado en Biología. Área Biología Molecular y Celular.  
PEDECIBA.

**“Caracterización y significado biológico de  
fragmentos derivados de ARN de  
transferencia”**

MSc. María Rosa García-Silva.

Orientador: Dr. Alfonso Cayota.

Tribunal de tesis: Dra. Beatriz Garat.

Dr. Otto Pritsch.

Dra. Andrea Villarino.

Montevideo, diciembre, 2013.

Institut Pasteur de Montevideo.

---

## AGRADECIMIENTOS

Se lo dedico a mi familia, marido y amigos, por estar siempre cuando los necesito.

A mis compañeros de laboratorio y laboratorios vecinos por el interés que siempre demuestran.

Al personal técnico del Instituto Pasteur y a los integrantes de los laboratorios que me recibieron en Brasil en Curitiba y Rio de Janeiro que me ayudaron en esta tarea, muchas gracias.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el soporte de mi tutor el Dr. Alfonso Cayota.

Agradezco al tribunal de tesis que acepto leer y corregir el presente trabajo.

**"Los conceptos y principios fundamentales  
de la ciencia son invenciones libres  
del espíritu humano."**

**Albert Einstein**

## RESUMEN

El protozooario parásito *Trypanosoma cruzi* tiene un ciclo de vida complejo que incluye diversas formas celulares que se alternan entre huéspedes invertebrados y mamíferos. Para hacer frente a estos cambios *T. cruzi* sufre modificaciones rápidas en la expresión génica que se consiguen esencialmente a nivel post- transcripcional. Sin embargo, los mecanismos precisos de esta fina regulación aún no se han podido dilucidar completamente. En la actualidad, las familias de los pequeños ARNs reguladores no codificantes (sARNs) es decir microARNs y siARNs son reconocidos como actores clave en la regulación post- transcripcional de genes en la mayoría de los eucariotas que se han estudiado, sin embargo, *T. cruzi* carece de estas vías de sARNs canónicos. En un esfuerzo reciente de nuestro grupo de trabajo donde se tenía como principal objetivo identificar la presencia de vías de sARNs alternativas en *T. cruzi*, se reveló la presencia de una población homogénea de sARNs derivados de ARNt maduros (denominados tsRNAs, tRFs o mitades de ARNt) y otros ARNs no codificantes, incluyendo derivados de ARNr, snoRNAs , CDS y regiones intergénicas. A su vez también se pudo evidenciar la presencia de una proteína Argonauta distintiva de tripanosomátidos que con los fragmentos derivados de ARNt son reclutados en gránulos citoplasmáticos particulares en epimastigotes de *T. cruzi*. Sobre la identidad de estos gránulos tan característicos tampoco se tiene gran conocimiento, pero los mismos se asemejan a reservosomas. En la presente tesis mediante el uso de secuenciado masivo y diferentes técnicas de microscopía electrónica de transmisión hemos demostrado que epimastigotes estresados secretan altos niveles de microvesículas al medio extracelular que contienen poblaciones selectivas de sARNs intracelulares como carga; también mostramos que las mitades de ARNt son reclutadas en varios organelos vesiculares que sugieren que su biogénesis es parte de rutas endocíticas/exocíticas. Hemos revelado que esta carga se transfiere entre parásitos y a sus células huéspedes susceptibles, pero no a células no sensibles, las cuales se convirtieron en susceptibles con la incorporación artificial del contenido de dichas microvesículas. Además, las microvesículas secretadas por *T. cruzi* están involucradas en el ciclo de vida del parásito induciendo la transición hacia formas tripomastigotes metacíclicos infecciosos. Hasta donde sabemos, esta es una de las primeras evidencias de la existencia de transferencia de material genético a través del reino de los protistas a células de mamíferos que nos podría conducir a replantearnos algunos conceptos básicos de la biología huésped-patógeno.

# INDICE

<b><i>1. INTRODUCCIÓN</i></b>	<b><i>Página</i></b>
1.1 sARNs reguladores no codificantes.	5
1.2 siARNs, miARNs y piARNs.	7
1.3 Biogénesis. Mecanismos de acción de ARNnc (Proteínas Argonautas).	11
1.4 Nuevos ARNnc: tRFs y mitades de ARNt	13
1.5 Evolución de las vías mediadas por sARNs.	22
1.6 <i>Trypanosoma cruzi</i> .	23
1.7 Regulación de la expresión génica en <i>T. cruzi</i> .	26
1.8 Proteínas Argonautas en tripanosomátidos: TcPIWI-tryp.	27
1.9 ARNnc en <i>T. cruzi</i>	31
1.10 sARNs circulantes y Microvesículas secretadas	33
1.11 Microvesículas y <i>T. cruzi</i> .	36
HIPOTESIS:	38
1.11 OBJETIVOS GENERALES	38
1.12 OBJETIVOS ESPECIFICOS	39
<b><i>2. MATERIALES Y MÉTODOS</i></b>	
2.1 Cultivo de <i>T. cruzi</i> Dm28c y líneas celulares usadas.	40
2.2 Clonado de sARNs en metacíclicos.	40
2.3 Inmunoprecipitación de TcPIWI-tryp y Clatrina. Secuenciado masivo de sARNs co-inmunoprecipitados con TcPIWI-tryp	43

2.4 Northern blot, Western blot y RT-PCR para mitades de ARNt.	46
2.5 Inmunofluorescencia y FISH, adquisición y análisis de imágenes.	47
2.6 Marcado de parásitos y Ensayos de <i>transwells</i> .	48
2.7 Purificación de microvesículas secretadas por <i>T. cruzi</i> , secuenciado masivo de sARNs y proteómica de su contenido.	49
2.8 Microscopía electrónica	50
2.9 Ensayos de metaciclogenesis promovidos por microvesículas. Uso de Dynasore.	52
2.10 Ensayos de microarreglos con células HeLa co-cultivadas con microvesículas o sondas para mitades de ARNt.	53
2.11 Transformación de células K562 con el contenido de microvesículas y ensayos de infección con <i>T. cruzi</i> .	55
<i>Medios y soluciones en general</i>	56
<b>3. RESULTADOS</b>	
3.1 Clonado de sARNs en metacíclicos de <i>T. cruzi</i> Dm28c.	57
3.2 Sobre-expresión de TcPIWI-tryp no modifica fenotípicamente el perfil de sARNs ni produce cambios fenotípicos en parásitos.	59
3.3 TcPIWI-tryp une preferentemente fragmentos de ARNr y mitades de ARNt	61
3.4 Las mitades de ARNt y TcPIWI-tryp están asociados a Clatrina y son reclutados en reservosomas y vesículas intracelulares.	66
3.5 TcPIWI-tryp y las mitades de ARNt son intercambiadas entre parásitos mediante microvesículas.	71
3.6 Epimastigotes sometidos a stress nutricional liberan gran nivel de microvesículas al medio.	75
3.7 El perfil de los sARNs cargados en microvesículas secretadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> revela la existencia de una firma molecular específica	

para la fracción extracelular.	80
3.8 El contenido proteico y de sARNs de las microvesículas es diferente entre cepas de <i>T. cruzi</i> : Brener, Dm28c e Y.	85
3.9 Las microvesículas secretadas por <i>T. cruzi</i> promueven la metaciclogenesis.	89
3.10 Los sARNs contenidos en microvesículas secretadas por <i>T. cruzi</i> son transferidos a sus células huésped susceptibles.	92
3.11 La Incorporacion del contenido de MVs secretadas por <i>T. cruzi</i> en células HeLa modifica su expresión génica.	95
3.12 La incorporación del contenido de las microvesículas en células no-susceptibles confiere susceptibilidad a la infección.	101
<b>4. DISCUSIÓN</b>	105
4.1 Impacto esperado de los resultados y perspectivas.	122
Abreviaturas	123
Referencias	124
<b>5. MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>	
5.1 Sondas de ARN/ ADN, oligonucleótidos y anticuerpos usados.	1
5.2 Lista con resultados del Análisis preliminar de proteómica de microvesículas de tripomastigotes de diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> .	3
5.3 Secuenciado intracelular versus extracelular microvesicular secretado.	9
5.4 Revisiones realizadas en el marco de esta tesis:	14
Garcia-Silva, M. R., F. Cabrera-Cabrera, M. C. Güida and A. Cayota (2012). "Hints of tRNA-Derived Small RNAs Role in RNA Silencing Mechanisms." <u>Genes</u> 3(4): 603-614.	
Garcia-Silva, M. R., F. Cabrera-Cabrera, M. C. Güida and A. Cayota (2013). "Novel aspects of tRNA-derived small RNAs with potential impact in infectious diseases." <u>Advances in Biochemical and Biotechnology</u> 4(5A).	
5.5 Artículos publicados, aceptados y enviados en el marco de esta tesis:	15

- 
- Garcia-Silva, M. R., C.-C. F., R. Neves, T. Souto-Padron, W. de Souza and A. Cayota (2013). "Gene Expression Changes Induced by *Trypanosoma cruzi* Shed Microvesicles in Mammalian Host Cells. Relevance of tRNA-derived halves." Mol Biochem Parasitol Submitted.
- Garcia-Silva, M. R., R. Neves, C.-C. F., J. Sanguinetti, M. LC, C. Robello, N. H, F.-C. T, T. Souto-Padron, W. de Souza and A. Cayota (2013). "Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation and susceptibility to infection of mammalian cells." Parasitol Research In press.
- Garcia-Silva, M. R., J. Sanguinetti, C.-C. F., O. Franzen and A. Cayota (2013). "A particular set of small non-coding RNAs is bound to the distinctive Argonaute protein of *Trypanosoma cruzi*: insights from RNA-interference deficient organisms." Gene Sometido-Bajo Revision.
- Garcia Silva, M. R., J. Sanguinetti, C.-C. F., A. Parodi, R. Neves, T. Souto-Padron, W. de Souza, C. Rovira, C. Robello and A. Cayota (2012). "Microvesicles secreted by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA machinery and function as a system of intercellular communication and life cycle regulation " Journal of Extracellular vesicles 1: 18182
- Garcia Silva, M. R., J. P. Tosar, M. Frugier, A. Parodi, C. Rovira, C. Robello, S. Goldenberg and A. Cayota (2011). "*Trypanosoma cruzi* produces a population of tRNA-derived small RNAs which are recruited to specific cytoplasmic granules and secreted to the extracellular medium." BMC Proceedings 5(Suppl1).
- Reifur, L., M. R. Garcia-Silva, S. B. Poubel, L. R. Alves, P. Arauco, D. K. Buiar, S. Goldenberg, A. Cayota and B. Dallagiovanna (2012). "Distinct subcellular localization of tRNA-derived fragments in the infective metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz 107(6): 816-819.

## 1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 sARNs reguladores no codificantes.
- 1.2 siARNs, miARNs y piARNs.
- 1.3 Biogénesis. Mecanismos de acción de ARNnc (Proteínas Argonautas).
- 1.4 Nuevos ARNnc: tRFs y mitades de ARNt
- 1.5 Evolución de las vías mediadas por sARNs.
- 1.6 *Trypanosoma cruzi*.
- 1.7 Regulación de la expresión génica en *T. cruzi*.
- 1.8 Proteínas Argonautas en tripanosomátidos: TcPIWI-tryp.
- 1.9 ARNnc en *T. cruzi*
- 1.10 sARNs circulantes y Microvesículas secretadas
- 1.11 Microvesículas y *T. cruzi*.

### HIPOTESIS:

1.11 OBJETIVOS GENERALES

1.12 OBJETIVOS ESPECIFICOS

### 1.1 ARNs reguladores no codificantes

En eucariotas, la síntesis de un producto génico funcional (ARN o proteína) es un proceso complejo compuesto por varias etapas, cada una de las cuales está sujeta a regulación (Alberts 2002). El control de la expresión génica es esencial para los seres vivos, tanto para los organismos unicelulares que deben cumplir ciclos de vida complejos con más de un hospedero, como para los organismos pluricelulares, donde es necesario para la generación del patrón diferencial de proteínas en los distintos tipos celulares, momentos del ciclo celular y en respuesta a estímulos externos.

Las células de los diferentes organismos contienen una variedad de ARNs no codificantes (ARNnc) que son transcritos pero no traducidos a proteínas. Hasta hace no mucho tiempo, los ARNnc eran conocidos por cumplir funciones genéricas en la célula, como lo son los ARNr y ARNt involucrados con el mecanismo de la traducción de ARNs mensajeros (ARNm), los ARNs pequeños nucleares (snARNs) relacionados con el procesamiento del ARNm y ARNs pequeños nucleolares (snoARNs) involucrados con la modificación de los ARNr.

Luego de la descripción del genoma humano las mejores estimaciones de genes codificantes para proteínas dan cuenta de unos 30.000 a 40.000 genes lo que representa aproximadamente un 1% del genoma (Wright et al. 2001). En la pasada década con el advenimiento de las tecnologías de secuenciado masivo o profundo comenzó la caracterización de una familia de ARNnc que se ha descubierto no presentan estas funciones genéricas (Eddy 2001; Carninci and Hayashizaki 2007). Los ARNnc fueron divididos esquemáticamente en diferentes grupos de acuerdo al tamaño reportado. En estos grupo se incluyeron los

ARNnc pequeños (sARNs) de tamaños entre 20-32 nt, por ejemplo la familia de los micro ARNs

(miARNs) (Bartel 2004), entre 100 a 200 nt los ARNnc comúnmente encontrados como reguladores de la traducción en bacterias (Masse et al. 2003), con 500 nt el ARN perteneciente a la telomerasa (Collins 2006) y los ARNnc más largos representados por el ARN Xist de 17Kb en humanos (Plath et al. 2002) y el ARN Air en ratón de 108 Kb (Sleutels et al. 2002).

Esta familia en expansión de ARNs reguladores tienen como rol primordial la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional (Nelson et al. 2003; Kim and Nam 2006). Esta novedosa forma de regulación de la expresión génica se ha encontrado en la mayoría de los organismos en los que se ha buscado, por lo que se la considera una vía de control universal más que excepcional (Lee et al. 2004; Pillai 2005; Kim and Nam 2006). Hoy es cada vez más evidente que las moléculas de ARN por sí mismas pueden y tienen un gran repertorio de funciones biológicas y en particular -como fue predicho ya hace 45 años por Jacob y Monod - que pueden ser ampliamente empleadas como clave en la regulación de la expresión génica, tanto en *cis* como en *trans* especialmente en los eucariotas (Mattick and Makunin 2006).

El descubrimiento de este nuevo mundo del ARN o como se lo ha denominado recientemente “The RNA underworld” ha llevado a considerar nuevos cambios en la concepción que tenemos hasta hoy del dogma central de la Biología Molecular. En una revisión Mattick y colaboradores intentan definir como encajarían los ARNnc en el modelo general aceptado de la expresión génica (ADN-ARN-proteínas) (Kenzelmann et al. 2006). En el mencionado trabajo, los autores plantean una nueva definición del flujo de la información génica, los genomas eucariotas producirían dos salidas paralelas: las proteínas cuya actividad bioquímica representaría una señal analógica, y los ARNnc que envían señales secuencia-específicas a manera de codificaciones digitales elaborando señales directas a blancos ARN o ADN (Kenzelmann et al. 2006).

Como se mencionó, los sARNs están representados por moléculas de ARN de entre 20 a 32 nucleótidos. Estos sARNs tienen la capacidad de reprimir o silenciar la expresión génica a nivel transcripcional o post-transcripcional a través de un mecanismo de reconocimiento basado en secuencias complementarias a los mismos (RNA-guided gene silencing) (Kim 2005). Actualmente se la considera una de las familias más abundantes de factores reguladores de la expresión génica capaz de regular entre el 30% al 40% de los genes codificantes para proteínas. Los pequeños ARNs pueden desencadenar el silenciamiento actuando en los diferentes niveles de regulación de la expresión de un gen: formación de la heterocromatina, re-arreglos cromosómicos (eliminación de ADN), metilación del ADN, silenciamiento meiótico mediado por ADN no apareado, degradación del ARNm y represión de la traducción (Cerutti and Casas-Mollano 2006; Chu and Rana 2007).

El rol natural propuesto para esta familia de reguladores de la expresión génica está basada en la regulación fina de la expresión génica (Bartel 2004). Amplias evidencias experimentales los vinculan con patologías complejas como el cáncer y otras alteraciones del desarrollo y la diferenciación celular (Volinia et al. 2006).

Los sARNs reguladores hoy se distribuyen en 3 familias principales:

- siARNs (pequeños ARNs de interferencia),
- miARNs (micro ARNs) y
- piARNs (ARN pequeños asociados a proteínas Piwi).

## 1.2 siARNs, miARNs y piARNs

Los siARNs, del inglés “*small interference*”, son pequeños ARNs de 21-25 nucleótidos (nt) que se originan del procesamiento de largos transcritos de ARN doble cadena (ARNdc) (Kim and Nam 2006). Pueden ser codificados endógenamente, como han sido descritos en plantas y nemátodos (Kim and Nam 2006) o exógenamente (Zamore and Haley 2005), cómo los siARNs introducidos experimentalmente (transgénesis) o en forma natural a través de virus.

Esquemáticamente, los siARNs son generados a partir de ARNdc precursores más largos los cuales son procesados por ribonucleasas de tipo III denominadas genéricamente “Dicer” para dar lugar a fragmentos de ARNdc de 21-25 nt de largo con grupos 5’ fosfato y dos nucleótidos 3’ sobresalientes en los extremo del ARNdc (Zhang et al. 2004) los cuales son característicos de la actividad de las ribonucleasas tipo III. La cadena de ARN que funcionará como guía es cargada por el complejo efector del silenciamiento génico, RISC (del inglés, *RNA-induced silencing complex*, (Hammond et al. 2001; Liu et al. 2004). El RISC está compuesto por varias proteínas de las cuales hasta el momento se identificaron más de 15 (Peters and Meister 2007). Sin embargo, el “mínimo” complejo activo, requiere solo del pequeño ARN y de las proteínas de la familia Argonauta las cuales constituyen el componente primordial del complejo. En humanos y *Drosophila* algunos subtipos de proteínas Argonauta (Ago2) poseen actividad endonucleasa de ARN usualmente referida como “*slicer*” la cual es responsable de la degradación del ARNm blanco (Hall 2005).

El complejo RISC “cargado” con el siARN actúa como guía del complejo efector en el reconocimiento de las regiones complementarias accesibles a nivel del ARNm blanco. Dependiendo de la complementariedad en el apareamiento de bases puede ocurrir la degradación del ARNm blanco o la inhibición de la traducción del mismo (Kim 2005). RISC corta de forma ATP independiente al ARNm entre las bases 10 y 11 del pequeño siARN. La cadena del pequeño ARN permanece asociada al RISC permitiendo realizar múltiples rondas de cortes de ARNm blancos (Filipowicz et al. 2005).

En algunos eucariotas, la formación del ARNdc precursor requiere de proteínas ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRP, del inglés *RNA dependent RNA polymerase*)

(Wassenegger and Krczal 2006). Las proteínas RdRP generan ARNdc a partir de transcritos simple cadena mediante la síntesis *de novo* de manera independiente de cebadores (Baulcombe 2004; Wassenegger and Krczal 2006).

Los miARNs representan evolutivamente pequeños ARNs conservados que derivaron de productos génicos que codifican para precursores cortos de ARNdc (Kiefer 2006). Se definen como ARNs de 20 a 25 nt que presentan estructuras secundarias particulares y baja complementariedad con sus blancos (Lagos-Quintana et al. 2001). Se unen a sitios específicos en el ARNm blanco y controlan la expresión génica a nivel post-transcripcional regulando la traducción del mensajero o su estabilidad en el citoplasma (Zamore and Haley 2005). A pesar de que están presentes en plantas y animales, existe poca conservación entre genes particulares de miARN, así mismo, presentan diferencias tanto en la ruta de biogénesis como en el mecanismo de acción. En su conjunto, estos datos sugieren que los mecanismos de miARNs surgieron de manera independiente en los diferentes *phyla* (Cerutti and Casas-Mollano 2006).

En plantas, la mayoría de los miARNs se localizan en regiones intergénicas (Reinhart et al. 2002), en animales, aunque puede haber excepciones, aproximadamente un 50% se localiza en regiones intergénicas y el resto principalmente en los intrones y exones de unidades transcripcionales (Saini et al. 2007). La mayoría contienen promotores para la polimerasa II, pueden tener varias kilobases de largo, una 7-metilguanosa 5' ("*capeado*" 5' o 5'cap) y están poliadenilados en el extremo 3' (cola polyA) (Saini et al. 2007; Zhou et al. 2007). Algunos miARNs forman agrupamientos o *clusters* para coordinar su expresión, de manera tal que el transcripto primario (pri-miARN) contiene secuencias para diferentes miARNs (Bartel 2004).

Un esquema de la biogénesis y mecanismo de acción de miARNs se puede apreciar en la **Figura 1** en comparación con los siARNs y los piARNs, en el núcleo el pri-miARN se pliega en estructuras de horquilla características, con apareamientos imperfectos, es procesado por una endorribonucleasa de tipo III (RNAsa III), Drosha, que actúa en conjunto con proteínas de unión a ARNdc denominadas Pasha en *Drosophila* y DGCR8 en humanos (Kim 2005). Drosha corta ambas cadenas del pri-miARN en la región más lejana al bucle de la horquilla definiendo uno de los extremos del miARN maduro, y dando origen al precursor de miARN (pre-miARN), también con forma de horquilla, que generalmente tiene ~70pb (Lee et al. 2003). El pre-miARN es transportado desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5 (Yi et al. 2003; Lund et al. 2004). En el citoplasma el pre-miARN es reconocido por Dicer que corta ambas cadenas del pre-miARN en la región más cercana al bucle de la horquilla, definiendo el segundo extremo del miARN maduro y dando origen a un ARNdc pequeño de ~ 22 pb (Sontheimer and Carthew 2004). Una de las cadenas del miARN maduro, generalmente la que tiene menor energía en el extremo 5' del dúplex se ensambla en el complejo efector llamado miRNP (del inglés: *microRNA ribonucleoparticle*), también llamado miRISC (del inglés *miRNA induced silencing complex*) (Tomari and Zamore 2005).

El mecanismo de acción de los miARNs varía dependiendo del grado de apareamiento del mismo con el ARNm blanco. Los miARNs de plantas se aparean de forma perfecta a sitios en el ARNm blanco causando la degradación del ARNm mediante un mecanismo similar al del siARN (Zamore and Haley 2005). En plantas los sitios pueden estar en la región 3' no traducida (3'UTR, abreviación que proviene del inglés, *3' untranslated region*) pero generalmente se encuentran en los marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*) (Jones-Rhoades et al. 2006). También se han encontrado sitios predichos en los extremos 5'UTRs (Sunkar and Zhu 2004). En animales se aparean de forma imperfecta a sitios específicos, generalmente localizados en las regiones 3'UTR del ARNm blanco y en múltiples copias (Bartel 2004). Una de las reglas del apareamiento entre el miARN-ARNm implica el apareamiento perfecto y continuo de una serie de nucleótidos de la región 5' del miARN, llamada región "semilla" (Grimson et al. 2007).

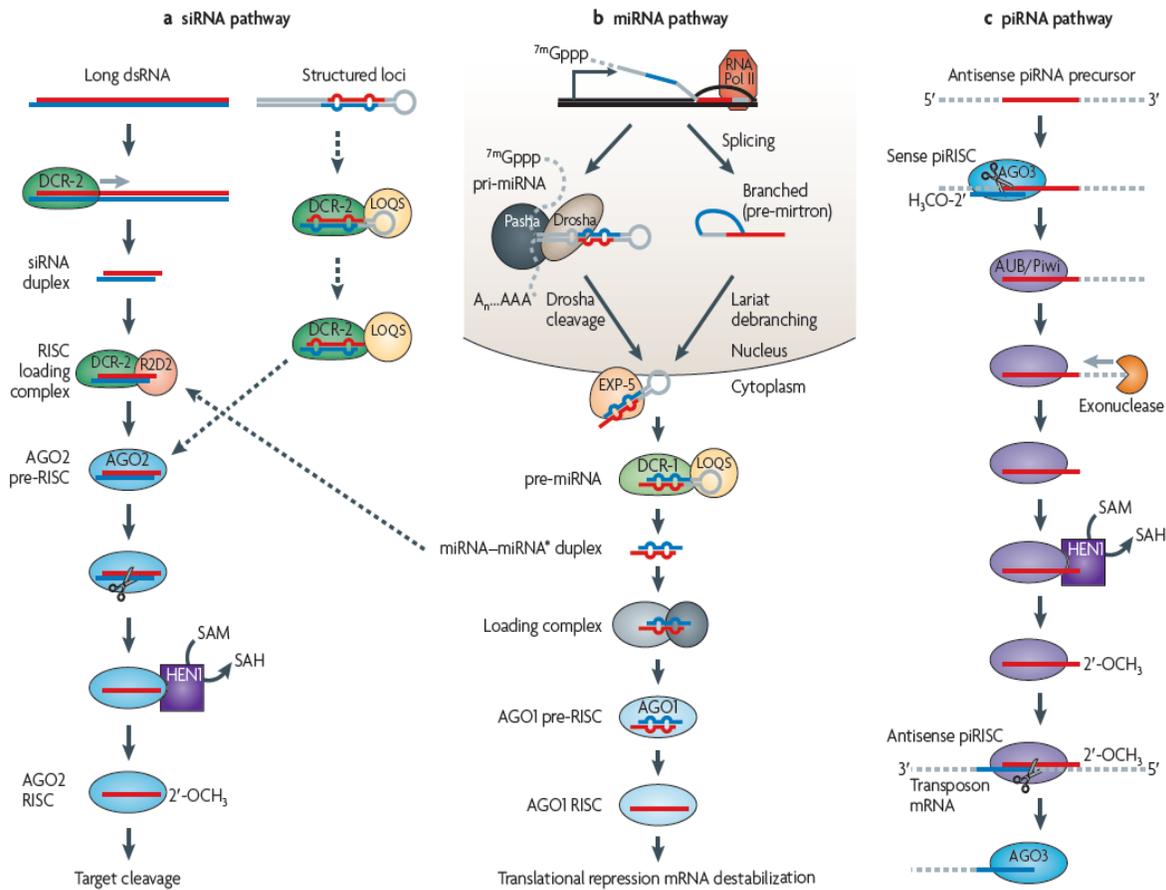
Los miARNs pueden actuar a nivel de:

- 1) Inhibición del inicio de la traducción (inhibición de la unión del 5'cap y de los factores de iniciación de la traducción).
- 2) Bloqueo en la fase de elongación de la traducción.
- 3) Provocando la terminación prematura de la traducción causando la disociación de los ribosomas.
- 4) Provocando la degradación proteica a nivel co-traducciona.

En los últimos años se identificaron sitios citoplasmáticos, dinámicos y discretos, donde se localizan ARNm traduccionalmente inactivos. Dichas estructuras fueron llamadas cuerpos de procesamiento (cuerpos P) o cuerpos GW, por la presencia de la proteína de unión al ARN, GW182 (Eystathioy et al. 2002). Los cuerpos P son sitios donde ocurren diversos procesos post-transcripcionales, como remoción del cap5', degradación 5'-3' del ARNm, represión traducciona y el silenciamiento mediado por miARNs (Sheth and Parker 2003; Cougot et al. 2004; Teixeira et al. 2005). Los ARNm inhibidos por miARNs se acumulan en los cuerpos P (Pillai 2005). Existe intenso debate acerca de si la localización en estas estructuras es una causa o consecuencia del silenciamiento. Además de localizarse en los cuerpos P, los ARNm reprimidos por miARNs y las proteínas argonauta pueden acumularse en gránulos de estrés (Anderson and Kedersha 2006). Los gránulos de estrés solo se forman en condiciones de estrés como su nombre lo indica, o cuando el inicio de la traducción es inhibido, revelando que podrían tener un rol en la regulación de la traducción mediada por miARNs (Leung et al. 2006). En el 2007 dos trabajos publicados independientemente por el grupo de Goldenberg y cols en Curitiba y de Frasch y cols en Buenos Aires identificaron en *T. cruzi* estructuras del tipo cuerpo P-like por un lado (Holetz et al. 2007) y de gránulos de estrés (Cassola et al. 2007) por otro, lo que indicaría una posible existencia de un mecanismo de sARNs en estos parásitos aún no descrito.

A esta clasificación deben sumarse unos sARNs encontrados recientemente en células germinales y precursores indiferenciados (“*stem cells*”) de mamíferos denominados Piwi-interacting RNAs (piARNs) de aproximadamente 30 nt de longitud. Los mismos son expresados durante la espermatogénesis, mayormente en las espermátidas y aparecen asociados a proteínas Argonautas del tipo PIWI, y asociados a polisomas, lo que sugiere su potencial rol en la regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional en los procesos de organogénesis y embriogénesis (Kim 2006; Qi et al. 2006).

Son codificados por el propio genoma en agrupamientos de 1 a 100 kb, cada “*cluster*” contiene entre 10 y 4500 piRNAs. Casi todos los piARNs de un mismo “*cluster*” tienen la misma orientación, lo que sugiere que los piARNs son procesados a partir de un largo precursor común (Kim 2006). En algunos casos se ha indicado que estos “*clusters*” pueden ser sintetizados a partir de un promotor central de forma bidireccional. En *Drosophila sp* existe una subfamilia de piARNs llamados rasiARNs (*repeat associated siRNAs*) que son sARNs implicados en la programación epigenética así como en el silenciamiento de los retrotransposones en células germinales (Kim 2006; Vagin et al. 2006; Lin 2007). Debido a su reciente identificación todavía no está dilucidada su vía de biogénesis así como su mecanismo de acción, aunque se conoce que el procesamiento es independiente de ribonucleasas de tipo III (Dicer o Drosha) utilizados por siARNs y miARNs.



**Figura 1. Vías de silenciamiento génico en *Drosophila*.** Esquema comparativo de las 3 vías principales que se conocen hasta hoy de silenciamiento génico mediado por “sARNs” : siARNs, miARNs y piARNs (explicadas en el texto). Tomada de (Ghildiyal and Zamore 2009).

### 1.3 Biogénesis. Mecanismos de acción de ARNnc (Proteínas Argonautas).

Existen 4 mecanismos conocidos a través de los cuales los “sRNAs” luego de aparearse total o parcialmente con las secuencias de ARNm o ADN blanco reprimen o modifican la expresión génica:

- Degradación del ARNm mediante endonucleasas (siARNs)
- Represión de la traducción del ARNm (miARNs)
- Represión transcripcional por modificación de histonas o metilación del ADN (“rasiARN”)

- Eliminación de ADN promovida por modificación de histonas

El destino del ARNm reconocido por un sARN depende del grado de apareamiento entre ambos, de la región del ARNm donde se produce y del tipo de proteínas asociadas en los complejos efectores (Meister et al. 2005). Cuando el apareamiento es perfecto o casi perfecto el resultado es la degradación del ARNm ya sea esta a nivel de la región codificante o extremos 3'UTR, mientras que el apareamiento incompleto de bases y especialmente en el sector 3'UTR de los ARNm su resultado es una inhibición de la traducción.

Los “*rasiRNA*” usualmente existen a nivel nuclear y actúan sobre secuencias complementarias del ADN y no de ARNm e inducen modificaciones de histonas (metilación) o bien modificaciones del ADN y se vinculan a la regulación de la transición eucromatina heterocromatina (Meister et al. 2005).

Existen varias proteínas accesorias claves ya nombradas anteriormente en la biogénesis y función de los distintos sARNs (Meister et al. 2005). En resumen existen 2 Ribonucleasas de tipo III esenciales en su biogénesis: “Dicer” (Bernstein et al. 2001) y “Drosha” que contienen dominios de unión a ARNdh. Dicer es una enzima altamente conservada con 2 dominios N-terminales esenciales constituidos por dominios ARN helicasa (DexH) y PAZ, es de localización predominantemente citosólica y degrada los precursores en fragmentos de 21-22 nt. Drosha en cambio es de localización nuclear y actúa preferencialmente sobre la maduración de largos precursores de miARN (pri-miARNs) de 500 a 1000 pb los cuales cliva para rendir los pre-miARNs de 80 a 120 bp, que serán exportados al citoplasma y posteriormente procesados por Dicer en los miARNx maduros simple hebra de ~21 nt.

Otros componentes clave son las proteínas de la familia Argonauta que son capaces de interactuar con los sARNs (Shi et al. 2004; Shi et al. 2004) formando diferentes complejos efectores como RISC (Pham et al. 2004; Kim 2005), miRNP y RITSC (*RNA-induced Initiation of Transcriptional Silencing Complex*) dependientes de siARNs, miARNs y rasiARNs respectivamente. Estas proteínas reciben su nombre por la apariencia de las hojas de algunos mutantes de *Arabidopsis thaliana*, las cuales se asemejan a la forma de un pequeño calamar del género argonauta (Bohmert et al. 1998), a su vez este calamar recibe ese nombre por su semejanza con el barco de los Argonautas, antiguos guerreros de la mitología griega.

Las proteínas Ago tienen 3 dominios esenciales (PAZ y Piwi), el dominio PAZ reconoce e interactúa con los extremos 3' ARNdh, el dominio Piwi posee homología estructural con ribonucleasas tipo H y un dominio MID (“middle”) entre el dominio PAZ y Piwi (Parker et al., 2005; Yuan et al., 2005) capaz de anclar el extremo 5' fosfato del sARN. Se ha demostrado que Ago 2 en humanos tiene la capacidad efectora de degradación endonucleolítica del ARNm blanco (“*slicer*”) (Liu et al. 2004; Kim 2005). Las proteínas Argonautas se han clasificado en 3 subfamilias: a) Argonauta propiamente dichas o Ago-like similares a AGO1 de *Arabidopsis thaliana*, b) Piwi-like, relacionadas con las proteínas PIWI (*P-element induced wimpy testis*) de

*D. melanogaster* (Carmell et al. 2002); y c) recientemente identificadas el grupo 3 específico de *C. elegans* (Yigit et al. 2006). Basados en similitud de secuencias, la familia Argonauta en mamíferos se ha separado en 2 grupos las subfamilias Ago y PIWI (Peters and Meister 2007). Estudios de expresión demuestran que la subfamilia argonauta está distribuida universalmente en todos los tejidos y participa en los complejos efectores y de procesamiento de siARNs y miARNs. Por el contrario las proteínas Piwi solo se expresan en células indiferenciadas o germinales durante la embriogénesis y organogénesis (Meister et al. 2004; Girard et al. 2006).

A estas hay que sumarle otras proteínas que forman parte del ensamblaje de los complejos y/o actúan como co-factores en las actividades de procesamiento de sARNs, y que fueron nombradas al hablar de los cuerpos P.

Por lo detallado anteriormente se puede concluir que hasta el momento la maquinaria responsable del silenciamiento génico ya sea mediante siARNs o miARNs es muy similar pudiéndose reducir a tres o cuatro complejos proteicos principales y sus proteínas.

#### 1.4 Nuevos ARNnc: mitades de ARNt y tRFs

En los últimos años, con el advenimiento de nuevas y mejores tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, han surgido un número creciente de nuevas clases de sARNs, diferentes a los ya bien estudiados miARNs o siARNs, los cuales aparecen como nuevos actores en la regulación de la expresión génica. Uno de estos nuevos miembros que sorprendentemente son la clase más conservada de sARNs a lo largo de la escala evolutiva, son los sARNs derivados de ARNt. Estos sARNs podrían representar las vías de sARNs más primitivas que dieron origen a las vías de silenciamiento canónicas por sARNs reportados en eucariotas superiores. Los sARNs derivados de ARNt han generado un interés especial por el nuevo papel de las moléculas de ARNt en vías de regulación celular y la amplia gama de organismos en los que se han descrito. Me gustaría destacar en esta sección la relevancia de estos nuevos sARNs en la regulación de la expresión génica y su relación con los fenómenos de interferencia de ARN. Una lista detallada de las características principales de esta nueva familia se resume en la **Tabla 1**.

**Tabla 1:** Resumen de las principales características conocidas hasta la fecha del fenómeno de escisión de ARNt en los diferentes organismos estudiados y su relación con los mecanismos de ARNi. Modificada de (Garcia-Silva et al. 2012).

Especies	Especificidad en Clivaje	Nucleasa	Función celular	Relación con ARNi	tipo
<i>E. coli</i> (Levitz et al. 1990; Ogawa et al. 1999; Tomita et al. 2000)	ARNt <sup>Tyr, His, Asn, Asp, Lys, Arg</sup>	Prrc, ColicinaE5 y ColicinaD	Durante Infección por Fago T4	N/D	-
<i>T. thermophila</i> (Lee and Collins 2005)	Todos ARNt		Reducción de ARNt no cargados. Progresión del ciclo celular. Inanición de aminoácidos esenciales.	N/D	-
<i>S. coelicor</i> (Haiser et al. 2008)	Todos ARNt		Diferenciación celular	N/D	-
<i>A. fumigatus</i> (Jochl et al. 2008)	Todos ARNt		Conidiogénesis. Regulación negativa de síntesis de Proteínas.	N/D	Mitades de ARNt
<i>S. cerevisiae</i> (Thompson et al. 2008; Thompson and Parker 2009)	Todos ARNt	Rny1	Stress oxidativo	N/D	-
<i>G. Lamblia</i> (Li et al. 2008)	Todos ARNt		Enquistación y ambientes adversos. Regulación negativa de síntesis de Proteínas.	N/D	Mitades de ARNt sitRNAs
<b>Mammalian cells</b> (Thompson et al. 2008; Lee et al. 2009; Yamasaki et al. 2009; Emara et al. ; Haussecker et al. 2010; Ivanov et al. 2011)	Todos ARNt	ELAC2 DICER Angiogenin a tRNasaZ Otras	Condiciones de stress (oxidativo, golpe calórico, UV diferencias en osmolaridad). Regulación negativa de síntesis de Proteínas.	Asociados a Ago2, 3 y 4. Posible función como miARNs/siARNs.	Mitades de ARNt 5'tRFs 3'CCA tRFs 3'U tRFs
<i>T. cruzi</i> (Franzen et al. ; Garcia-Silva et al. 2011)	ARNt <sup>Glu, Asp, Tyr, Val, Arg, His, Thr</sup>	N/D	Stress nutricional.		Mitades de ARNt
<i>Drosophila</i> (Schaefer et al. 2010)	Todos ARNt	PIWI	Condiciones de stress.	Asociados a PIWI	-
<i>A. Thaliana</i> (Thompson et al. 2008)	Todos ARNt	N/D	Condiciones de stress nutricional y oxidativo. Regulación negativa de síntesis de Proteínas.	N/D	-
<i>C. maxima</i> (Zhang et al. 2009)	Todos ARNt	-	Inhibición de la traducción.	N/D	-

Por lo que se puede apreciar en la **Tabla 1**, los diferentes autores han clasificado a los sARNs derivados de ARNt en dos clases diferentes: Las mitades de ARNt (en inglés: tsRNAs y/o tRNA halves), son aquellos que resultan del clivado a nivel del bucle del anticodon del ARNt

maduro y por lo tanto miden entre 30-35 nts de largo, y aquellos que surgen del clivado de los bucles D o T que resultan ser más cortos que las mitades de ARNt de aproximadamente 20-22 nts de longitud, los denominan fragmentos derivados de ARNt o tRFs por su nombre en inglés.

- ***Mitades de ARNt:***

Las mitades de ARNt o también llamadas fragmentos derivados de ARNt inducidos por estrés o tiRNAs (de *tRNA derived stress-induced fragments*), pueden derivar tanto de la mitad 3' como 5' del ARNt maduro y se encuentran en muy diversos organismos como se aprecia en la **Tabla 1**. Las mismas aparecen como la vía por sARNs más conservada a lo largo de la escala evolutiva, y frecuentemente es desencadenada por diferentes clases de estrés, nutricional, biológico o fisicoquímico. Este clivado desencadenado como respuesta a diferentes estímulos causados por estrés es llevado a cabo por diferentes anticodon nucleasas. En humanos por ejemplo puede ser llevado a cabo por la Angiogenina y en levaduras por Rny1 (Thompson et al. 2008). Estas mitades de ARNt frecuentemente provienen de transcritos de ARNt ya procesados, esto se deduce de que hasta el momento las mitades encontradas carecen de secuencias intrónicas y algunas presentan extremos 3' CCA que indican el procesamiento del ARNt maduro. En la **Figura 2 A** se puede apreciar un esquema de las vías de biogénesis de estas mitades de ARNt. No obstante, a pesar de que los ARNt maduros serían la fuente de los fragmentos de ARNt, no se ha observado una disminución significativa en los niveles de ARNt maduros celulares por lo que implicaría que sólo una pequeña parte del total de ARNt maduro estaría implicado en este procesamiento (Thompson et al. 2008).

- ***tRFs:***

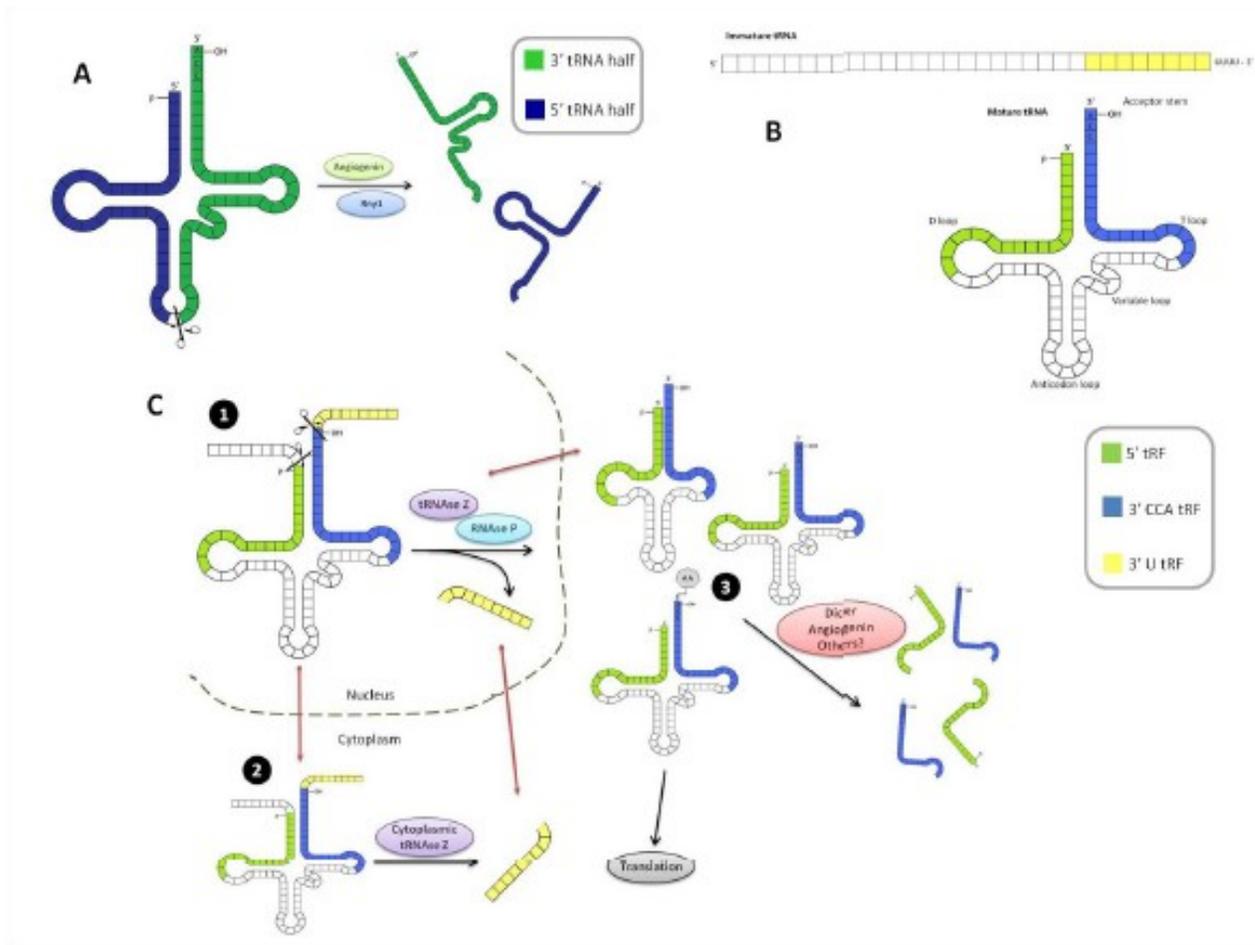
Los tRFs han sido clasificados en 3 grupos, considerando la región del ARNt maduro del cual provienen. Un grupo, los denominados 5'tRFs, incluye aquellos tRFs que derivan de la mitad 5' del ARNt maduro o inmaduro. Otro grupo, comprende aquellos tRFs derivados de la mitad 3' del ARNt maduro y presentan la secuencia CCA en su extremo 3', son los denominados 3' CCA tRFs. El último grupo deriva del extremo 3' de los ARNt inmaduros, no procesados, o de los pre-ARNt, y se los denomina 3' *trailers* o 3'U tRFs. Estos últimos tienen como característica la presencia de un repetido de Uridinas en su extremo 3' como consecuencia de la terminación de la transcripción de la ARN polimerasa III. Esta nomenclatura es la propuesta por Sobala y Hutvagner (Sobala and Hutvagner 2011), para Lee y colaboradores serían tRF-5, tRF-3 y serie tRF-1 respectivamente, mientras que Haussecker y colaboradores los denominan a los 3' CCA tRFs como Tipo I, y a los 3' U tRFs como Tipo II (Lee et al. 2009; Haussecker et al. 2010). En la **Figura 2 B** se puede observar un esquema de estas tres clases de tRFs.

- ***Biogénesis de los sARNs derivados de ARNt:***

La generación y mecanismo de acción de estas moléculas no están todavía completamente dilucidados. Se conoce que la generación de estos sARNs utiliza en algún punto la maquinaria de maduración de las moléculas de ARNt. Este es el caso por ejemplo para los 3' U tRFs, los mismos son generados por una RNasa de ARNt Z (tRNasa Z) que remueve el extremo 3' en el procesamiento de los pre-ARNt inmaduros. Este paso del procesamiento ocurre en el núcleo, mientras que todos los tRFs estudiados se han encontrado en el citoplasma, lo cual sugiere que después de su generación necesitan ser exportados del núcleo (Haussecker et al. 2010; Liao et al. 2010). Una alternativa que se ha planteado a esta idea sería la presencia de una tRNasa Z citoplasmática que procesara ARNt que fueron exportados prematuramente del núcleo. Para el caso de los 5' tRFs, su biogénesis en células de mamífero es llevada a cabo por Dicer mediante el clivado a nivel del bucle D del ARNt maduro (Cole et al. 2009), sin embargo en *Schizosaccharomyces pombe* la generación de 5' tRFs es independiente de Dicer (Sobala and Hutvagner 2011). Las diferencias entre la generación y el tamaño de los 5' tRFs entre estos organismos respaldan la idea de que una proteína diferente a Dicer sería la responsable de estos procesamientos en organismos inferiores evolutivamente como las levaduras (Sobala and Hutvagner 2011). En el caso de los 3' CCA tRFs, su generación parece ser dependiente de Dicer e involucra un corte a nivel del bucle T (Haussecker et al. 2010). Teniendo en cuenta que en su extremo 3' presentan la secuencia CCA, su procesamiento solo puede haber ocurrido después que el ARNt es sometido al clivado por ambas enzimas de maduración RNasa P y tRNasa Z. El clivado por Dicer ocurre en el citoplasma y por lo tanto las moléculas de ARNt ya deben de haber sido exportadas del núcleo. Este transporte puede llevarse a cabo en diferentes etapas de la maduración del ARNt, pueden transportarse moléculas mal plegadas, plegadas pero no aminoacetiladas, o totalmente maduras (Haussecker et al. 2010; Sobala and Hutvagner 2011). A pesar de los reportes de la generación dependiente de Dicer de los 3' tRFs y 5' tRFs, Li y colaboradores (Li et al. 2012) analizando datos de secuenciados masivos de células salvajes y células con la expresión de Dicer bloqueada, proponen que la generación de tRFs puede ser completamente independiente de Dicer. Estos resultados sugieren que la Angiogenina, la enzima responsable de la generación de mitades de ARNt, también podría estar involucrada en el procesamiento de las moléculas más cortas, los tRFs (Emara et al. 2010). En la **Figura 2 C** se muestra un esquema de las vías de biogénesis de fragmentos derivados de ARNt que hasta hoy se conocen.

Mediante el análisis de las vías de generación de estas moléculas se desprende que las mismas presentan muchas características comunes con los miARNs y los siARNs. Su tamaño es muy similar, lo que podría sugerir que la enzima involucrada en su procesamiento es la misma. Se conoce que Dicer por ser una RNasa de clase III funciona como una regla molecular, generando productos de una longitud bien definida (20-25 nts) (Jinek and Doudna 2009). Otro aspecto interesante es que muchos de estos fragmentos derivados de ARNt se han encontrado asociados a proteínas de la familia Argonauta (Cole et al. 2009; Haussecker et al. 2010; Miyoshi et al. 2010; Tuck and Tollervey 2011). Estas evidencias podrían sugerir una implicancia de los

tRFs y mitades de ARNt en los mecanismos de silenciamiento génico mediados por sARNs. Algunas evidencias empíricas que avalan esta hipótesis serán discutidas a continuación.



**Figura 2. A.** Se muestra la generación de mitades de ARNt a partir de ARNt maduros a través de su clivado por diferentes enzimas (Angiogenina o Rny1). **B.** Clasificación de tRFs en 3 grupos reconocidos: 3' U tRFs, 3' CCA tRFs y 5' tRFs. **C.** Esquema de las vías de biogénesis de tRFs hasta hoy descritas: Los 3' U tRFs pueden ser generados en el núcleo por la tRNasa Z durante la maduración del ARNt (1) y seguidamente exportados al citoplasma. Alternativamente, ARNt inmaduros pueden ser exportados prematuramente del núcleo y ser sujetos al clivado por tRNasas Z citoplasmáticas (2). En el caso de los 3' CCA tRFs y 5' tRFs, los mismos pueden ser generados en cualquier punto después del procesamiento del ARNt por tRNasa Z y RNasa P, mediante la acción de Dicer y posiblemente otras proteínas, incluyendo Angiogenina (3).

- **Evidencias de mitades de ARNt y tRFs como ARNs reguladores:**

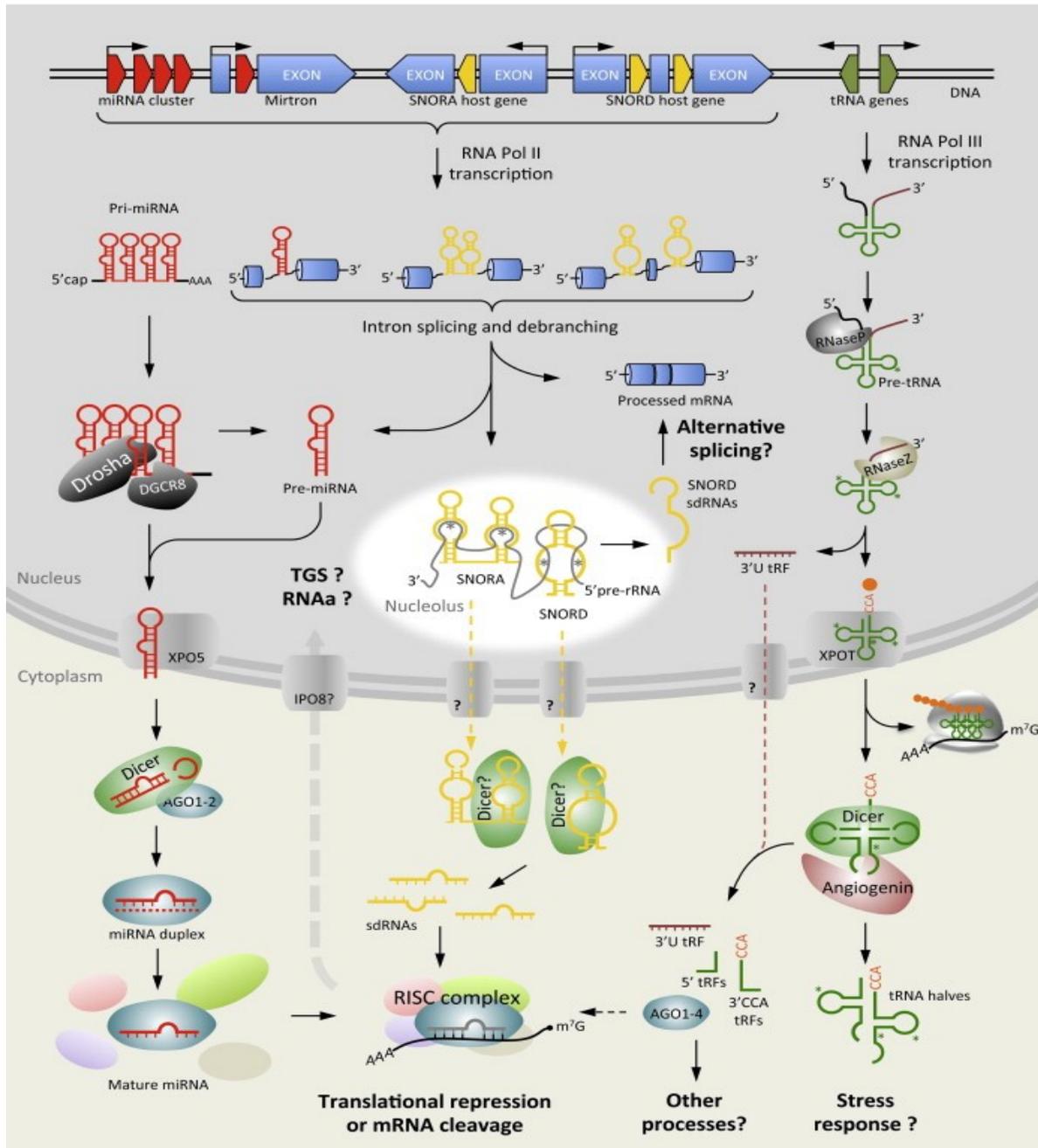
Uno de los resultados más interesantes sobre este respecto es lo que surge del análisis de diferentes secuenciados masivos de sARNs unidos a proteínas Dicer, donde se observa una fracción muy abundante de sARNs derivados de ARNt (Cole et al. 2009). En este trabajo los autores demostraron que los ARNt pueden ser clivados a partir de un intermediario que presente una horquilla de una manera muy similar a como son procesados los miARNs. Además el factor clave para llevar a cabo este procesamiento parecería ser Dicer. A esto se suma que estudios recientes han descubierto también la asociación de diversos fragmentos de ARNs no codificantes que no son miARNs unidos a proteínas Argonautas (Burroughs et al. 2011). Entre estos sARNs asociados con proteínas Argonautas es posible encontrar, por ejemplo, fragmentos derivados de snoRNAs (Ender et al. 2008) además de los ya nombrados ARNt, los cuales son sometidos al clivado de su precursor de ARN luego de su asociación con proteínas Argonautas y de la formación del complejo funcional RISC. Estos complejos RISCs que serían “no miARN portadores” parecen ser capaces de regular la expresión génica de un ARNm blanco como lo hacen los RISCs “portadores de miARNs”. De esto se puede concluir que diferentes sARNs derivados de ARNs celulares pueden asociarse a las proteínas Dicer y Argonautas de las vías de sARNs canónicos (miARNs y siARNs). Esta asociación probablemente este compitiendo con los miembros clásicos ya mencionados y en algún nivel aun no descrito pueda regular estas vías, por ejemplo si se somete a la célula a algún tipo de estrés.

Un caso interesante es el reportado por Yeung ML y cols (Yeung et al. 2009), en el cual demuestran que pequeñas moléculas conteniendo horquillas derivadas de ARNt se asocian con proteínas Argonauta 2 y pueden actuar como siARNs causando la degradación de un ARNm blanco correspondiente a una secuencia en particular del genoma de HIV. Por otro lado, Nashimoto y cols mostraron recientemente que los ARNt de células de mamíferos pueden ser guías de silenciamiento *in vitro* mediante la tRNasa Z. Estas moléculas serian capaces de clivar un ARNm que lleve secuencias complementarias al pequeño ARNt guía que ellos denominan sgRNA (del inglés *small guide tsRNA*) (Tamura et al. 2003). Los autores denominaron a este fenómeno “*TRUE gene silencing*” sería un tipo de regulación de un ARNm específico que se basa en las propiedades de la tRNasa Z siendo guiada por sgRNAs. En un trabajo posterior, los mismos autores encontraron que estos sgRNAs artificiales pueden ser clasificados en cuatro tipos diferentes: mitades 5' derivadas de ARNt, heptámeros de ARN, bucles de ARN y ARNs lineares de 14 nts de largo. Con respecto a lo que nos concierne, cabe destacar que las mitades 5' derivadas de ARNt endógenas funcionan efectivamente como sgRNAs para la tRNasa Z *in vivo* en células de mamífero (Tamura et al. 2003).

Elbarbary y colaboradores (Elbarbary et al. 2009) han usado mitades 5' del ARNt de Glutámico exitosamente para disminuir el nivel de un ARNm que contiene su secuencia blanco en células de humano. Sus resultados sugieren que la tRNasa Z guiada por mitades de ARNt puede estar implicada en las vías de señalización mediadas por p53. En otro trabajo reciente, demostraron que estos sgRNAs son capaces de guiar a la tRNasa Z para clivar miARNs y como consecuencia disminuir el nivel de los mismos en la célula; este puede ser uno de los primeros

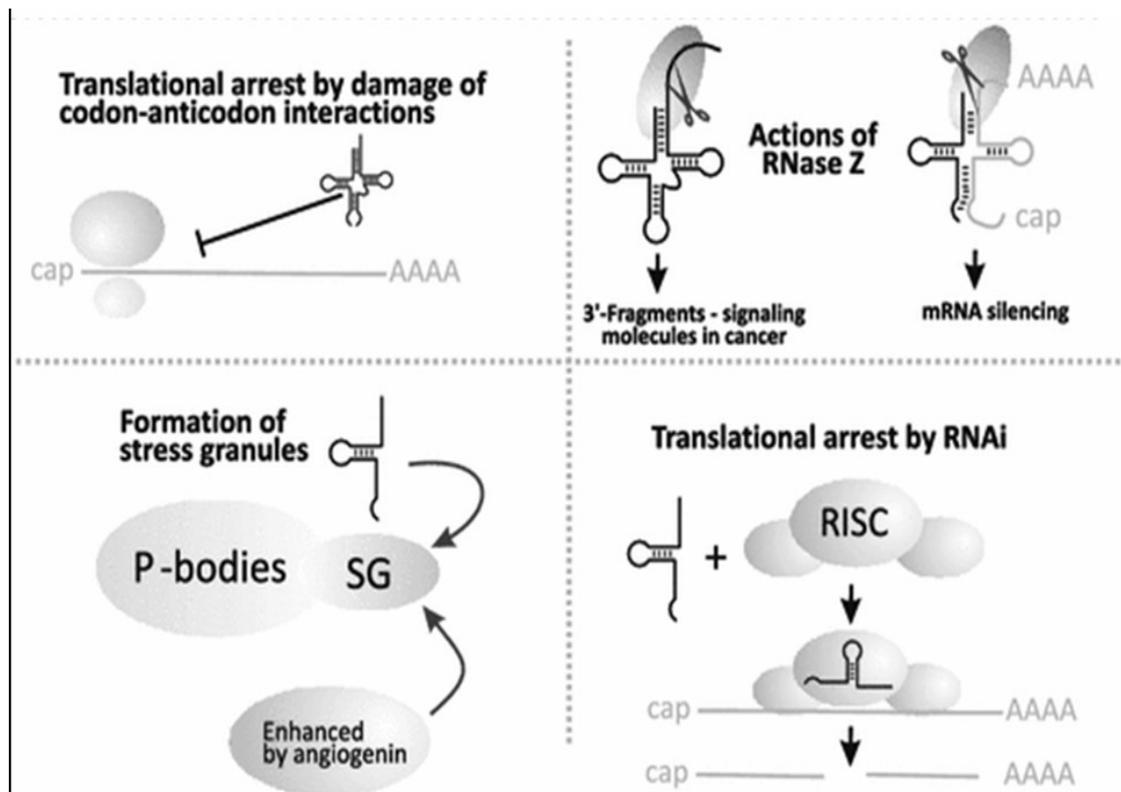
reportes de alguna molécula involucrada en la regulación de miARNs, hasta hoy no descritas. Los autores sugieren que estos hallazgos podrían tener relevancia por ejemplo en su uso como terapias para enfermedades causadas por la des-regulación de miARNs, por ejemplo el cáncer (Takahashi et al. 2012).

En conclusión, los pequeños ARNs derivados de ARNt podrían estar actuando como moléculas que interfieren con la maquinaria para siARNs o miARNs por un lado, y por otro lado re-dirigiendo esta maquinaria hacia un diferente destino, por ejemplo como respuesta a situaciones de estrés, regulando ahora un juego completamente diferente de ARNm. Esto demostraría que la maquinaria de ARNi puede estar siendo usada por diferentes moléculas pre-existentes en la célula para llevar a cabo diversas funciones como respuesta a variados estímulos. En la **Figura 3** se muestran las diferentes vías de generación de estos sARNs derivados de ARNt y su inter-cambio o comunicación con la maquinaria de ARNi.



**Figura 3. Comunicación entre las vías de biogénesis y efectoras de miARNs y ARNs snoARNs, ARNt y tRFs.** Se puede apreciar en la figura como estos diferentes sARNs pueden ser procesados por Dicer u otras nucleasas (Angiogenina, RNasa P o RNasa Z por ejemplo para ARNt) en el citoplasma en ARNdc cortos de 22-30 nts para poder ser cargados en los complejos efectoras RISCs. A partir de aquí son capaces de participar en diversos procesos que regularan la expresión génica de ciertos genes a nivel post-transcripcional. Tomado de (Martens-Uzunova et al. 2013).

Estos nuevos sARNs pueden ser muy diversos, presentado diferencias en su origen, en su biogénesis, tamaño, especificidad de clivado, abundancia y en el estímulo que desencadena su generación. En lo que a este trabajo respecta, cabe destacar que los mismos tienen muy variadas funciones y estarían involucrados en la regulación de la expresión génica a diversos niveles, algunas de las funciones conocidas para los mismos se muestran en la **Figura 4**. Los sARNs derivados de ARNt pueden funcionar a) a nivel post-transcripcional o traduccional; b) en procesos relacionados con ARNi; c) en la regulación del ciclo celular y la diferenciación y d) en algunos casos, parecerían estar compitiendo de una manera no-específica con la maquinaria de ARNi y por lo tanto con la especificidad y nivel de sus blancos.



**Figura 4. Funciones conocidas para los sARNs derivados de ARNt.** Por un lado tienen la capacidad de detener la traducción ya sea por la formación de un corte en el bucle del anticodón deteniendo el proceso de elongación o por su interacción con los complejos efectores RISCs actuando como siARNs. Por el otro lado, mediante la acción de diferentes nucleasas pueden degradar un ARNm blanco actuando como guías o secuestrarlo en cuerpos de procesamiento citoplasmáticos, modificado de (Nawrot et al. 2011).

En este punto me gustaría mencionar brevemente que además de los fragmentos derivados de ARNt, los sARNs pueden ser resultado del procesamiento de otras moléculas pre-existentes en las células como ARNr y snoARNs. Wei *et al.* estudiando conjuntos de datos de secuenciación masiva de sARNs de cuatro muestras diferentes, dos de ratón y dos de humanos,

reportaron recientemente la existencia de una gran población de sARNs derivados de ARNr unidos a proteínas Argonauta y sus complejos. Por otra parte, algunos de los denominados *srRNAs* que describieron estos autores tendrían gran relevancia biológica al estar potencialmente implicados en la progresión fisiológica y patológica de la diabetes (Wei et al.2013).

El estudio de Wei y colaboradores es uno de los primeros que demuestra la implicancia de los sARNs no canónicos en el desarrollo de una patología. Nuestro trabajo tiene como uno de sus objetivos centrales demostrar una implicancia similar para los fragmentos derivados de ARNt en la enfermedad de Chagas.

### 1.5 Evolución de las vías mediadas por sARNs.

El conocimiento de la diversidad de las familias de sARNs ha crecido en los últimos años a un ritmo alarmante debido principalmente a la implementación cada vez más frecuente del secuenciado masivo para conocer el transcriptoma de un organismo. Es de destacar de los últimos cinco años, la incorporación de los sARNs derivados de ARNt como un nuevo grupo de sARNs como ya hemos mencionado. En lo que respecta a nuestro proyecto, vamos a tener en cuenta los sARNs que tienen en común ciertas características como su unión a complejos efectores del tipo RISC y por lo tanto la inducción de silenciamiento génico mediado por proteínas claves de la familia Argonauta.

Aunque las vías mediadas por miARNs fueron principalmente identificadas en metazoarios, estudios recientes (Pasquinelli et al. 2000; Allen et al. 2004; Molnar et al. 2007) sugieren que los miARNs son un mecanismo más antiguo de regulación génica que pudo haber evolucionado antes de la “multi-celularidad”. En contraste a esto las vías de los piARNs son sólo encontradas en metazoarios (Girard et al. 2006; Saito et al. 2006; Houwing et al. 2007) y parecen haber surgido justo antes de la emergencia de la bilateralidad (Grimson et al. 2008).

Las proteínas Ago/Piwi y Dicer pueden ser seguidas hasta el ancestro común de los eucariotas (Cerutti and Casas-Mollano 2006). Sin embargo, esta maquinaria parece haberse perdido completamente o bien haber sido parcialmente simplificada en algunos organismos unicelulares como *Saccharomyces cerevisiae*, *T. cruzi*, *Leishmania major* y *Plasmodium falciparum*, los cuales son incapaces de utilizar ARNdc para disparar la degradación de ARNs blancos (Robinson and Beverley 2003; Ullu et al. 2004).

En especies que resultan “RNAi negativas” como *T. cruzi* y *L. major* una búsqueda genómica para proteínas claves del mecanismo por sARNs revela la presencia de un gen

codificante para una proteína Piwi-like que posee el característico dominio Piwi pero carece de un dominio PAZ identificable y cuyo rol biológico no se conoce (Ullu et al. 2004). Nuestro grupo de trabajo ha estudiado con más detenimiento el gen para estas proteínas en *T. cruzi*, del cual mostraremos y discutiremos los resultados encontrados más adelante en esta introducción, pero que se encuentran publicados en (Garcia Silva et al. 2010).

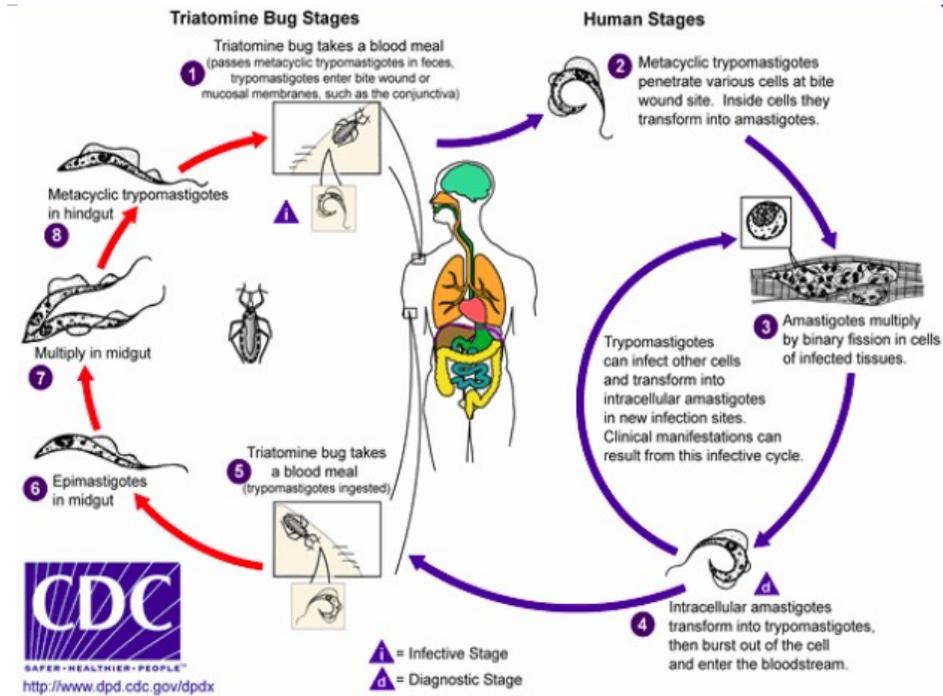
## 1.6 *Trypanosoma cruzi*.

Los tripanosomátidos constituyen un grupo de protozoarios parásitos que causan enfermedades eventualmente fatales en millones de humanos y animales a lo largo del mundo. *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* son responsables de la Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana), Enfermedad del Sueño (Tripanosomiasis Africana) y la Leishmaniasis respectivamente siendo su mayor prevalencia en los países en vías de desarrollo (Barrett et al. 2003).

En el presente trabajo usamos como modelo a *T. cruzi*, el mismo presenta un ciclo biológico complejo que se muestra en la **Figura 5**. El ciclo comienza cuando el vector invertebrado, que es un insecto hematófago, se alimenta del huésped vertebrado e ingiere una población pleomórfica de tripomastigotes. Dentro del estómago del insecto, los parásitos se transforman en epimastigotes y algunas formas intermedias redondeadas que son capaces de transformarse tanto en epimastigotes cortos, los que comienzan un proceso de multiplicación en el intestino, ó en epimastigotes largos que se mueven a la región más posterior del tracto digestivo del insecto. Aparentemente, estos epimastigotes largos, son incapaces de dividirse.

En el recto, cierta proporción de epimastigotes, se diferencia a tripomastigotes metacíclicos, los cuales durante la alimentación del insecto son eliminados con las heces cerca del sitio de la picadura. El prurito y rascado posterior del hospedador mamífero permite la penetración de los tripomastigotes al torrente sanguíneo, desde donde son capaces de invadir las células de varios tejidos del vertebrado (Tyler and Engman 2001; De Souza 2002; Girones et al. 2005). Una vez en la célula, la forma metacíclica se escapa de la vacuola endocítica, también conocida como vacuola parasitófora, y se transforman en amastigotes que se dividen repetidamente por fisión binaria. A altas densidades los amastigotes dan lugar a los tripomastigotes a través de formas intermediarias, algunas de las cuales tienen forma de epimastigotes. Las células que son prematuramente lisadas pueden también liberar amastigotes, los cuales son observados en el torrente sanguíneo durante la fase aguda de la infección. Estos amastigotes pueden servir para propagar la infección dado que ellos también son capaces de infectar células, particularmente células fagocíticas, aunque por un mecanismo diferente que los

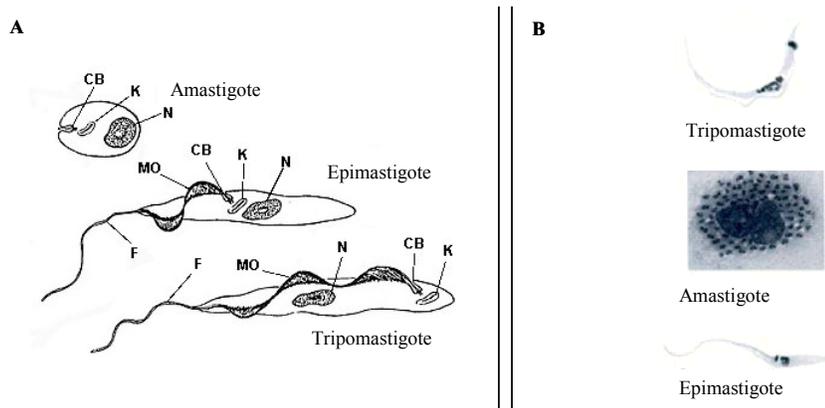
tripomastigotes. Finalmente la mezcla de tripomastigotes y amastigotes presentes en la sangre de un mamífero infectado sirve para completar el ciclo cuando es ingerido por un insecto vector (Tyler and Engman 2001; Andrade and Andrews 2005).



**Figura 5. Representación esquemática del ciclo de vida de *T. cruzi*.** Tomado de Centro para el control y la prevención de enfermedades (CDC) y descrito en el texto.

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

A nivel microscópico las formas de los diferentes estadios del ciclo pueden ser identificadas por la posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo de la célula y la emergencia del flagelo como se muestra en la **Figura 6** y se detallan a continuación:



**Figura 6. A. Esquema de los principales estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*.** K: kinetoplasto; CB: cuerpo basal; MO: membrana ondulante; F: Flagelo; N: Núcleo. **B.** Fotografías de las distintas formas de *T. cruzi* durante su ciclo de vida.

**Amastigote:** Estadio replicativo que se halla en el citoplasma de las células del hospedador mamífero o en cultivo celular. Pueden infectar otras células de vertebrados y su forma es característicamente esférica u ovalada de 2.4 a 6.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Algunos autores denominan a esta forma **esferomastigote**, forma aflagelada, ó forma leishmanial (De Souza 2002). Otros como Tyler y Engman consideran la forma esferomastigote como un estadio temprano de diferenciación a la forma epimastigote (Tyler and Engman 2001). En la **Figura 6** se muestra una relación esquemática entre los diferentes estadios de *T. cruzi*.

**Epimastigote:** Forma extracelular elongada, 20-40 x 2  $\mu\text{m}$ , con el kinetoplasto localizado en la parte anterior al núcleo. Posee un flagelo, el cual emerge por el costado del cuerpo celular y se libera por el extremo anterior, arrastrando la membrana citoplasmática en un trayecto breve. Esta forma es capaz de dividirse y es observada en cultivos axénicos y en el intestino del huésped invertebrado (De Souza 2002).

**Tripomastigote:** Forma infectiva y no replicativa. Tiene una longitud de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 2  $\mu\text{m}$ . El kinetoplasto está localizado posterior al núcleo, y el flagelo emerge a partir del mismo, dando lugar a una extensa membrana ondulante. Los tripomastigotes pueden ser observados en: (i) cultivos celulares y sangre del hospedador vertebrado, (ii) en el intestino posterior, en las heces del huésped invertebrado, (iii) en la fase estacionaria de crecimiento de un cultivo axénico, y (iv) en la fase líquida de un cultivo celular (De Souza 2002).

Algunos estudios más recientes y otros no tanto, han descrito que además de poder infectar a sus células huésped la forma infectiva tripomastigote, también lo pueden lograr las formas epimastigotes y amastigotes; con algunas diferencias en cuanto a tasa de replicación, diferenciación y tiempo de liberación de la célula. Estos estudios han demostrado que las diferentes formas de *T. cruzi* podrían invadir su célula huésped incluso con diferentes mecanismos de invasión (Tanowitz et al. 1975; Florencio-Martinez et al. 2010). En resumen, *T. cruzi* como otros parásitos intra-celulares exhibe un amplio repertorio de estrategias que le garantizan su invasión, establecimiento y persistencia en su célula huésped. Estas estrategias pueden variar para ganar el control de la maquinaria celular y de los mecanismos de defensa de su huésped.

## 1.7 Regulación de la expresión génica en *T. cruzi*.

Una de las características particulares de los tripanosomátidos es que sus genes codificantes para proteínas no presentan intrones (ausencia de “splicing”) y los mismos se encuentran organizados en densos grupos a nivel del ADN separados por cortas regiones intergénicas. Estos grupos de genes se transcriben como precursores policistrónicos que pueden tener hasta 60 kb (Johnson et al. 1987). Recientemente en el 2005, los genomas de los tres parásitos conocidos como “*trityps*” fueron publicados en un número especial de Science (El-Sayed et al. 2005) lo que marcó una importante etapa en la investigación de estos organismos. Estos trabajos denominados “*Trityps genome*” demostraron que estos parásitos comparten muchos elementos genéticos y biológicos.

Un hecho característico de estos parásitos es que la mayoría sino todos los ARNm presentan en su extremo 5’ una secuencia conocida como mini-exón o “*spliced-leader*”. En el caso de *T. cruzi* consta de 39 nt y es incorporado mediante una reacción de “*trans-splicing*” por la cual el ARN del mini-exón se adiciona al extremo 5’ de diferentes ARNm (De Lange et al. 1984). Se ha demostrado que este mini-exón es esencial para la correcta traducción de los ARNm (Ullu et al. 1993). Anteriormente al *trans-splicing* el extremo 5’ de los ARNm adquiere la estructura CAP o caperuza (del inglés capping 5’) al igual que otros eucariotas. Los transcriptos primarios de ARNm también sobrellevan un proceso de poliadenilación (Hug et al. 1994). La biosíntesis de grandes moléculas policistrónicas precursoras de ARNm conlleva la pregunta de cómo regulan la expresión génica los tripanosomátidos.

Existen varias evidencias para afirmar que, a diferencia de la mayor parte de los eucariotas, donde el principal punto de regulación es a nivel del inicio de la transcripción, en los tripanosomátidos la regulación es co- o post-transcripcional. Una vez sintetizado un ARN policistrónico, los genes para los que codifica pueden ser expresados según el siguiente detalle:

- a. con similares niveles, como las calmodulinas o tubulinas (Tschudi and Ullu 1988),
- b. a muy diferentes niveles, como los genes de la glicoproteína variable de superficie VSG (Pays et al. 1989),
- c. a niveles que varían significativamente dependiendo del estadio de desarrollo del parásito, como en el caso de la aldolasa (Vijayasarathy et al. 1990).

Estos y otros reportes indican que a diferencia de procariotas y la gran mayoría de eucariotas los tripanosomátidos carecen de una estructurada regulación a nivel transcripcional y por tanto la mayoría de los genes son transcritos “constitutivamente” y disponibles para su traducción en todo momento (Palenchar and Bellofatto 2006). De acuerdo a este concepto distintas evidencias apoyan la idea de que la regulación génica de estos parásitos es esencialmente a nivel post-transcripcional como : a) estabilidad o turnover de mensajeros (Palenchar and Bellofatto 2006); b) regulación de la movilización polisomal de ARNm

traduccionalmente activos (Milone et al. 2002) o bien c) la existencia de un equilibrio dinámico entre diferentes compartimientos citoplasmáticos denominados gránulos de ARN que reclutan moléculas para su degradación o bien para sustraer el ARNm del “pool” traduccionalmente activo (Anderson and Kedersha 2006).

Con respecto a este último ítem, los gránulos de ARN han sido encontrados en los tripanosomátidos en los últimos años intentando caracterizar la regulación génica de estos organismos esencialmente post-transcripcional. En una revisión reciente, Cassola A. (Cassola 2011) recopila resultados de diferentes trabajos en los que se muestra que el estrés nutricional en *T. cruzi* y *T. brucei* induce la formación de grandes gránulos citoplasmáticos que contienen diferentes proteínas de unión a RNA y RNA. Estos gránulos parecen ser muy variados dependiendo el estímulo que los genera, el estadio del ciclo de vida en el que se producen y las proteínas que contienen, algunos de los cuales son compartidos con levaduras y mamíferos (Cassola 2011). El estudio de este tipo de gránulos puede ser de relevancia en cuanto a la caracterización de diferentes respuestas celulares a cambios de ambiente en el ciclo biológico o con su relación con el huésped, por ejemplo.

## 1.8 Proteínas Argonautas en tripanosomátidos: TcPIWI-tryp.

De acuerdo a lo descrito anteriormente hemos especulado en la posibilidad que gran parte de la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos pudiese estar relacionada con el uso de “sARN” reguladores. El análisis filogenético de la presencia de componentes clave en la biogénesis de “sARN” en los genomas de tripanosomátidos ha sido recientemente examinada a través de genes homólogos a proteínas con dominios PAZ o Piwi como Dicer, argonautas, Dicer etc, vinculadas a la biogénesis y acción de los “sARNs” (Cerutti and Casas-Mollano 2006).

Como se puede observar en la **Tabla 2**, *T. brucei* posee todos los componentes de la vía estando ausentes en los dos tripanosomátidos evolutivamente cercanos o “emparentados” como *L. major* y *T. cruzi* (Cerutti and Casas-Mollano 2006). Por tanto, los genomas de *T. cruzi* y *L. major* no presentan genes con alta homología para proteínas Ago o Dicer a pesar de estar evolutivamente emparentados y dentro de una misma familia evolutiva. Esto implica que tanto *L. major* como *T. cruzi* no tendrían la capacidad de producir “siARN” o “miARN” maduros según el concepto actual poniendo en duda la esencialidad de la misma para los organismos vivos.

**Tabla 2:** Presencia de proteínas relacionadas al procesamiento de sARNs en protozoarios (tomada y modificada de (Cerutti and Casas-Mollano 2006)).

Especie	Estado del Genoma	Argonauta-Piwi	Dicer-like	RdRP
---------	-------------------	----------------	------------	------

<i>Giardia intestinalis</i>	ensamblado	+	+	+
<i>Trypanosoma brucei</i>	ensamblado	+	-	-
<i>Trypanosoma cruzi</i>	completo	-	-	-
<i>Leishmania major</i>	ensamblado	-	-	-

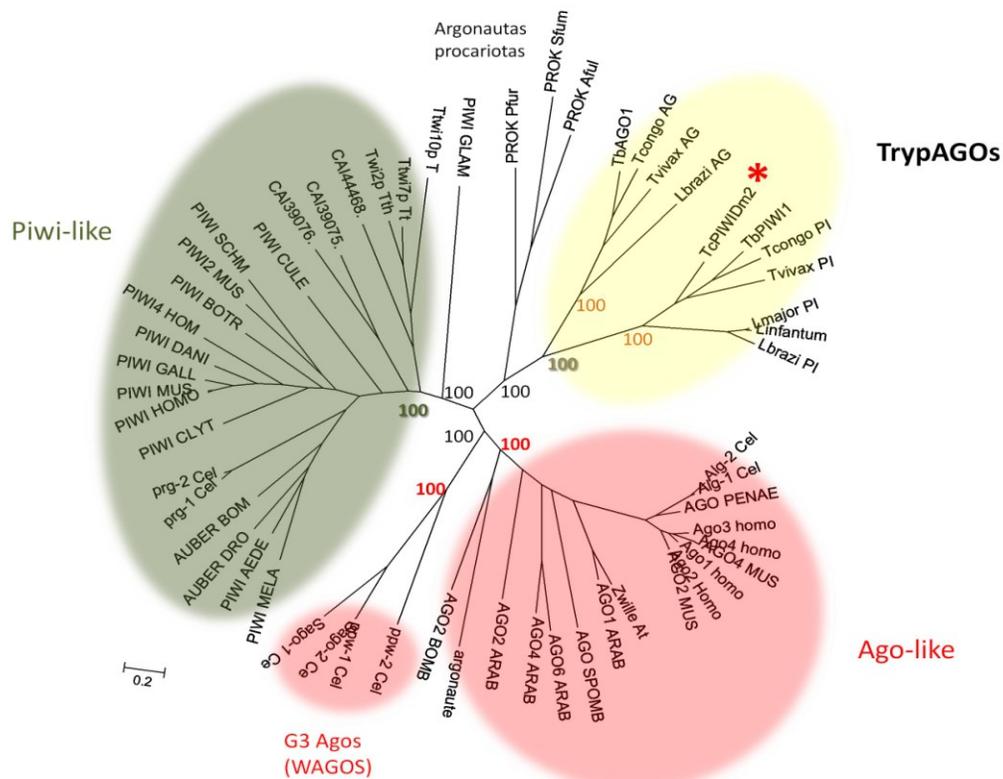
Estos datos tiene soporte experimental al haberse demostrado que en *T. brucei* ha sido posible inducir interferencia de ARN mediante ARNdc exógenos y la consecuente producción de siARNs (Shi et al. 2004) mientras que no se ha podido inducir el fenómeno experimentalmente en *T. cruzi* o *L. major*. Un resultado que surge de las búsquedas de estas proteínas en dichos organismos (*T. cruzi* y *L. major*) es la presencia de una proteína de aproximadamente 1000 aminoácidos con un dominio Piwi único pero sin dominio PAZ. Esta proteína en *T. cruzi* ha sido anotada como *T. cruzi* Ago- like protein 1 (TcPW11) en el NCBI y podría constituir una proteína homóloga a la subfamilia Piwi descrita en eucariotas superiores. La función de esta proteína con gran identidad entre Tripanosomátidos y con dominio Piwi es desconocida (Djikeng et al. 2004). En *T. brucei* su homólogo TbPW11, ha sido demostrado que no es necesario para la interferencia por ARN (Durand-Dubief and Bastin 2003). Por lo anterior, se piensa que el rol biológico original de estas vías no debería haber sido esencial en organismos unicelulares para cumplir con su ciclo biológico y su función primordial podría constituir un sistema de defensa contra “genomas parásitos” como virus y transposones (Buchon and Vaury 2006).

A pesar de su existencia en los ancestros eucariotas comunes, en ciertos organismos unicelulares como los tripanosomátidos (a excepción de *T. brucei*) esta maquinaria de sARNs parecería haberse “perdido”, haberse simplificado extensivamente o evolucionado en rutas alternativas dominadas por ARNs reguladores diferentes a los actualmente conocidos. Alternativamente, podría representar una vía ancestral y más primitiva con componentes no convencionales. De lo anterior surge el interés de nuestro grupo de trabajo en la posibilidad de poder comenzar a descifrar estos posibles novedosos mecanismos, a diferentes niveles.

En mi trabajo de tesis de maestría se comenzó a estudiar este miembro de la familia Argonauta en *T. cruzi* para poder caracterizarla y conocer su función. Como primera aproximación a una posible función regulatoria, se estudió la clasificación de esta proteína (y sus homólogos en tripanosomátidos) dentro de la familia Argonauta. Las proteínas Argonautas eucariotas se clasifican en dos grupos presuntamente parálogos: Ago-like y Piwi-like. Las primeras participan en los mecanismos de regulación por mARNs, siARNs y remodelación de la estructura de la cromatina, y presentan una expresión ubicua, mientras que las proteínas Piwi-like están restringidas a la línea germinal (Meister et al. 2004) y protegen la estabilidad del

genoma frente a elementos transponibles. Algunos linajes han perdido todos los representantes de una u otra sub-familia, como mencioné anteriormente, pero se postula que el antecesor común más reciente de todos los eucariotas poseía al menos una copia de cada gen (Cerutti and Casas-Mollano 2006).

Curiosamente, estudios filogenéticos realizados por distintos métodos muestran que todas las proteínas Argonauta de tripanosomátidos agrupan juntas, y por fuera de los grupos pre-definidos Ago-like y Piwi-like, como se puede apreciar en la **Figura 7**. Esto demuestra que las proteínas Argonauta de tripanosomátidos no parecen ser ni Ago-like ni Piwi-like desde un punto de vista filogenético. Esta afirmación es consistente además con la observación de los aminoácidos más conservados, y aquellos aminoácidos que definen a las subfamilias Ago-like y Piwi-like, por lo que se decidió denominarlas TcPIWI-tryp (Garcia Silva et al. 2010).



**Figura 7. Estudios filogenéticos de las proteínas Argonauta.** Se muestra cómo las ArgonAUTAs de tripanosomátidos forman un grupo distinto de los dos grupos parálogos Ago-like y Piwi-like definidos en eucariotas.

En ese mismo trabajo pudimos verificar la expresión de dicha TcPIWI-tryp a nivel de proteína y de ARNm durante todo el ciclo de vida de *T. cruzi* y subir la secuencia completa codificante al GenBank para la cepa Dm28c, con la cual trabajamos con el número de acceso HM126462.1 (Garcia Silva et al. 2010).

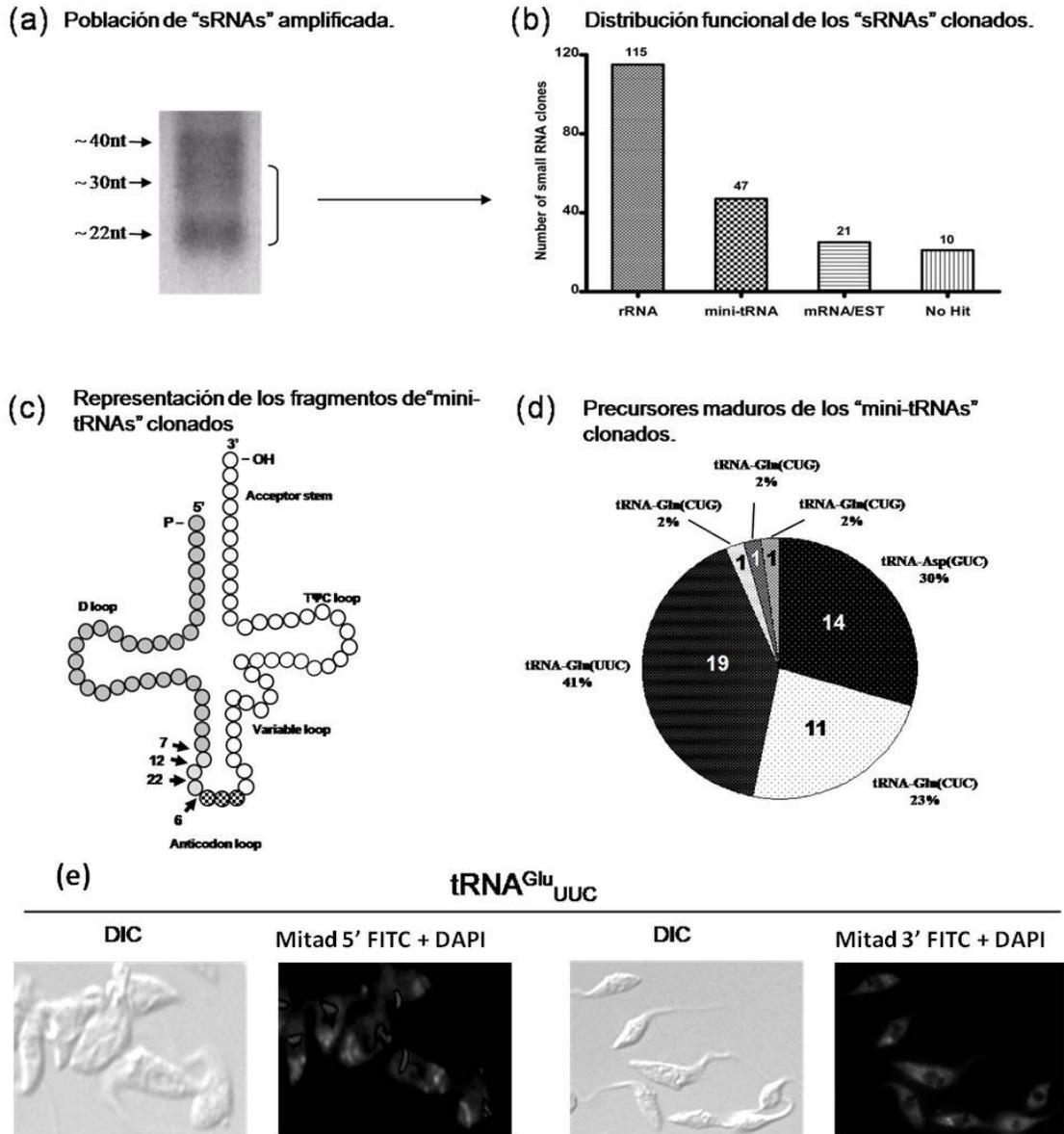
El esfuerzo actual de nuestro laboratorio se centra en estudiar el “interactoma” de TcPIWI-tryp mediante inmunoprecipitación y ensayos de colocalización por inmunofluorescencia, en la obtención de la proteína recombinante para ensayos de unión y estudios estructurales y en su sobre-expresión en *T. cruzi*. En conjunto estas estrategias permitirán obtener información sobre lo que tal vez sea una nueva función hasta el momento desconocida de las proteínas Argonauta, probablemente relacionada a los mecanismos ancestrales desde los cuales evolucionó toda la maquinaria de silenciamiento mediada por pequeños ARNs reguladores en eucariotas. Por último, su relación con los ARNnc descritos en estos organismos y que detallaremos a continuación.

## 1.9 ARNnc en *T. cruzi*

Como había indicado, resulta interesante el caso de especies cuyo control principal de la regulación génica es a nivel co o post-transcripcional y que resultan “ARNi negativas” como *T. cruzi*. Adicionalmente, este organismo presenta una posible proteína clave del mecanismo por sARNs que nombramos TcPIWI-tryp cuyo rol biológico no se conoce todavía. Por esto se eligió *T. cruzi* como modelo de estudio para poder demostrar la existencia de un sistema de generación de ARNs reguladores de la expresión génica en organismos que no presentan los componentes típicos o clásicamente conocidos. El mismo nos permitiría identificar un mecanismo original que explique la inusual falta de regulación a nivel transcripcional de organismos unicelulares patógenos para el hombre y que esté en la base de la regulación post-transcripcional de estos parásitos. Este trabajo se inicio con mi proyecto y tesis de maestría y continúa como mi tesis de doctorado.

Mediante el clonado de sARNs en *T. cruzi* se reportó la presencia de una población homogénea de sARNs derivados de ARNt maduros que representan cerca del 25% del total de pequeños ARNs clonados en epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c (**Figura 8 A y B**). Estudios adicionales demostraron que la producción de fragmentos derivados de ARNt aumenta bajo condiciones de estrés nutricional de los parásitos. Más del 98% de los fragmentos derivados de ARNt clonados provienen de las regiones 5' del ARNt<sub>Asp</sub> y ARNt<sub>Glu</sub> (**Figura 8 C y D**). Resultados de *Northern blot* revelaron la presencia de niveles menores de las regiones 5' y 3' derivadas de ARNt de estos y otros precursores. Sorprendentemente estos fragmentos derivados de ARNt se encontraron asociados a estructuras citoplasmáticas particulares de disposición granular que se acentúan en parásitos sometidos a estrés nutricional (**Figura 8 E**) (Garcia-Silva

et al. 2010). Los sARNs derivados de ARNt encontrados en nuestro trabajo pueden ser clasificados como mitades de ARNt según lo detallado anteriormente. El significado biológico de estos fragmentos derivados de ARNt en *T. cruzi* es hasta hoy desconocido, pero podrían representar la única subfamilia de pequeños ARNs con relevancia biológica presente en estos parásitos unicelulares.



**Figura 8. Clonado de sARNs en epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c.**(a) Gel de agarosa resultado de la electroforesis del producto amplificado usando los adaptadores específicos 5' y 3'. Se observan las poblaciones de "sRNAs" que van de ~18 a 40nt. (b) Distribución de los sARNs obtenidos de la librería en *T. cruzi*. (c) Representación de las secuencias de mitades de ARNt clonadas en círculos rellenos de color gris, los cortes 5' del tRNA y el número de veces clonados

están marcados por flechas y números respectivamente. **(d)**Distribución de los diferentes tipos de isoaceptores representados por las mitades de ARNt clonadas. **(e)** FISH que revela la distribución granular citoplasmática de las mitades de ARNt.

En el 2011, un año después de la publicación de nuestro trabajo, Franzen y colaboradores (Franzen et al. 2011) revelaron el transcriptoma de sARNs de epimastigotes de *T. cruzi* mediante secuenciado masivo. Los autores encontraron al igual que en nuestros datos, que la mayor porción de sARNs presentes en *T. cruzi* son mitades de ARNt. Por otro lado en su estudio las mitades mas representadas de ARNt fueron las 3'. A las mitades de ARNt le siguen sARNs derivados de rARNs, como en nuestro caso. Debido a la gran cantidad de secuencias estudiadas, los autores se permiten concluir que no se identifican miARNs u otros sARNs canónicos en el transcriptoma de este organismo, por lo que concluyen que estas moléculas no existirían en *T. cruzi* (Franzen et al. 2011).

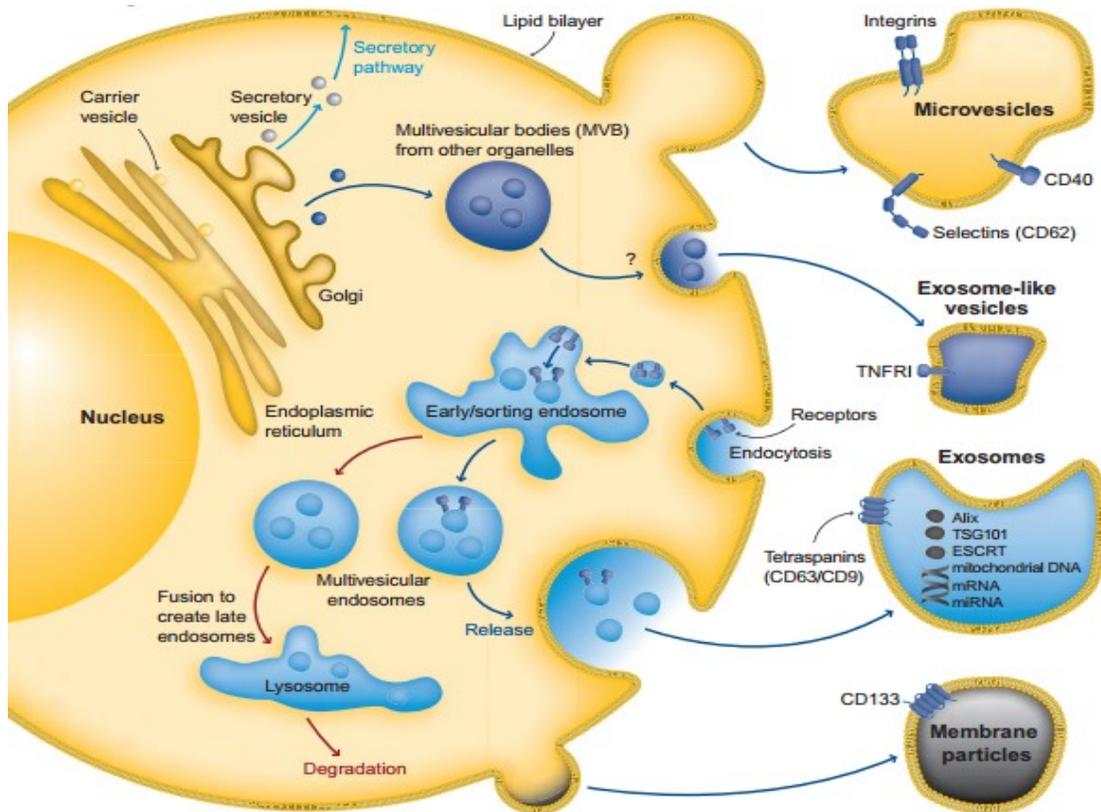
### 1.10 sARNs circulantes y microvesículas secretadas.

En los últimos años se han destacado una serie de hallazgos sobre la biología de los sARNs, cuando se encontró que los mismos se encuentran circulando en el medio inter-celular, ya sea en suero, plasma, medio o sobrenadante de cultivo celular, etc. Hoy se conoce que este ARN liberado por las células (ARNes) es sorprendentemente estable a pesar del gran contenido de RNasas presentes en el medio, por ejemplo en la sangre. La alta estabilidad y resistencia a la degradación de estas moléculas se logra principalmente por su empaquetamiento en estructuras rodeadas de membrana (exosomas, ectosomas y cuerpos apoptóticos) o por su unión a complejos ribonucleoproteicos (Cortez et al. 2011). Los diferentes tipos de microvesículas secretadas por una célula se detallarán a continuación y una figura esquemática de las mismas se puede apreciar en la **Figura 9**.

Los **exosomas** son microvesículas membranosas de origen endosomal que presentan un tamaño de entre 40-100nm de diámetro, las cuales son liberadas al espacio extracelular por una gran variedad de tipos celulares y circulan libremente en el medio (Mathivanan et al. 2010). Son originadas por invaginaciones internas de la membrana endosomal y se acumulan en cuerpos multivesiculares (MVBs: del inglés *Multivesicular Bodies*). Estas microvesículas transportadas por los MVBs pueden ser llevadas hacia lisosomas para su degradación por el proteasoma o a la membrana plasmática. En esta última, los MVBs se fusionaran y liberaran su contenido al espacio extra-celular, las vesículas liberadas reciben el nombre de exosomas. Los exosomas una vez liberados, pueden tener varios destinos: pueden adherirse a sus células receptoras a través de interacciones receptor-ligando, pueden fusionarse con la membrana y pueden ser internalizadas por la célula receptora mediante mecanismos como la endocitosis (Morelli et al. 2004; Mathivanan et al. 2010). En el 2007, Valadi y colaboradores (Valadi et al. 2007) reportaron en

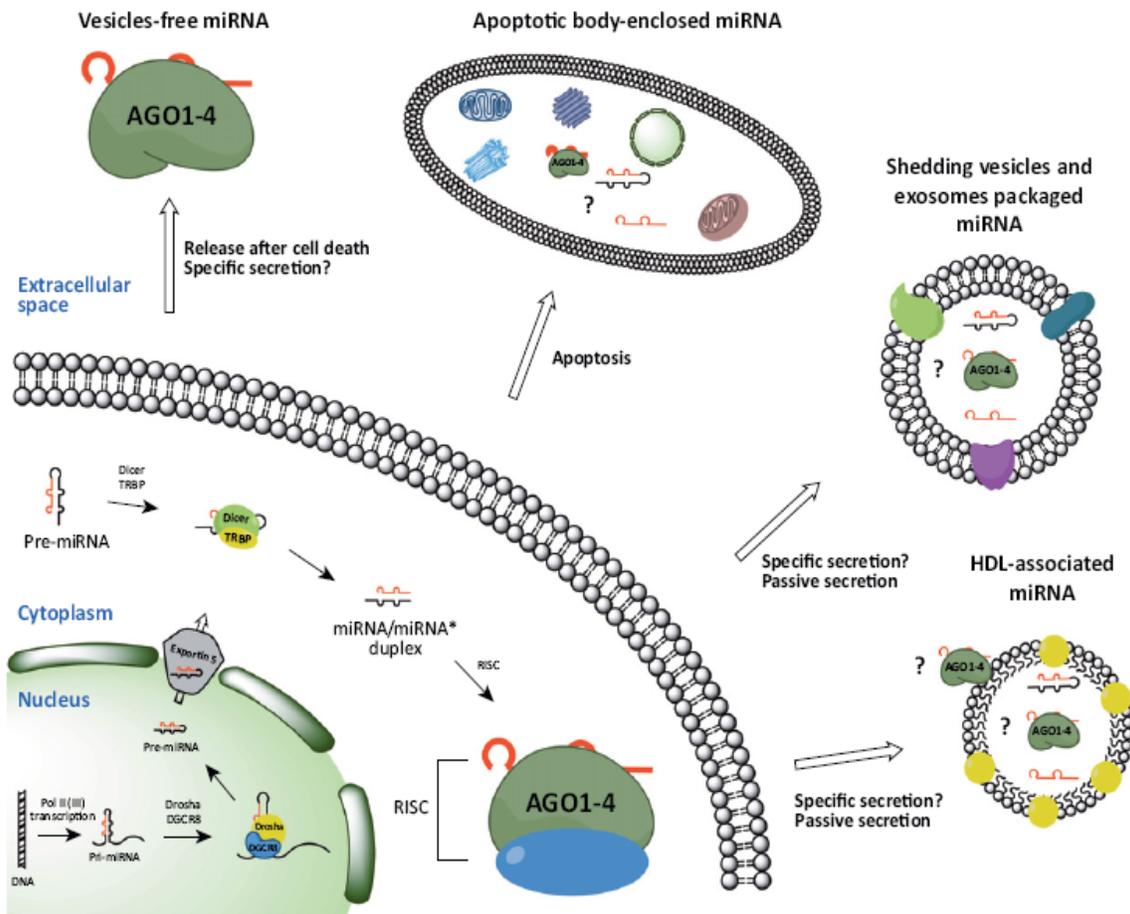
un estudio muy interesante, que los exosomas de células de mamíferos llevan en su contenido al menos mil ARNm, mas de cien miARNs conocidos y otros sARNs no bien caracterizados. Lo que es más interesante aun, es que estos ARNs secretados son completamente funcionales en las células que los reciben, a estos ARNs se los denomino en inglés: exosomal shuttle ARNs, esRNAs.

Los **ectosomas** son grandes microvesículas membranosas que se diferencian de los exosomas descritos anteriormente principalmente por su origen y tamaño. Los mismos pueden medir entre 0.2 a 1µm de diámetro, y son liberados desde la membrana plasmática como invaginaciones externas de la misma (Mathivanan et al. 2010). Se ha reportado que los mismos pueden actuar en la señalización y la transferencia horizontal de su contenido, el cual esta enriquecido en ARNm y proteínas específicas (Cocucci et al. 2009). Mediante esta transferencia, las microvesículas pueden adquirir importancia modificando el metabolismo de sus células receptoras, así como su información genética. A las mismas se las ha encontrado involucradas en procesos tan diferentes como la homeostasis celular de las células, en procesos fisiológicos normales y en patológicos (Hwang 2013).



**Figura 9:** Se muestran los diferentes tipos de microvesículas secretadas al medio extracelular por una célula y su biogénesis. Modificado de: [http://docs.abcam.com/pdf/general/secreted\\_extracellular\\_vesicles\\_web.pdf](http://docs.abcam.com/pdf/general/secreted_extracellular_vesicles_web.pdf).

En los últimos años, se ha revelado que los miARNs y otros ARNnc, transportados por microvesículas corresponden solamente a una fracción de los miARNs circulantes. Una representación esquemática de las diferentes vías por las cuales puede secretarse un miARN puede observarse en la **Figura 10**. Se han encontrado una gran proporción de miARNs circulando asociados a proteínas Argonautas, principalmente Ago2 (Arroyo et al. 2011). Por otra parte recientemente también se ha demostrado que lipoproteínas de alta densidad (HDL) y proteínas nucleolares como Nucleofosmina son capaces de transportar un amplio espectro de miARNs circulantes, llevándolos a sus células receptoras donde cumplirán sus funciones biológicas (Wang et al. 2010; Vickers et al. 2011). Estas observaciones conjuntamente indican que proteínas específicas y HDL podrían estar participando en mecanismos de comunicación inter-celular mediante el transporte y entrega de miARNs de una célula a otra. Estos resultados han generado todo un nuevo campo de investigación sobre los sARNs circulantes, principalmente para entender su función y poder usarlos como herramientas de diagnóstico por ejemplo.



**Figura 10. Biogénesis de miARNs acoplada a las diferentes vías de empaquetamiento y secreción de los mismos.** Una vez que la molécula de miARN está madura en el citoplasma

puede ser incorporada en cualquiera de las microvesículas o en ribonucleocomplejos, mostrados en la figura. Modificado de (Turchinovich et al. 2012).

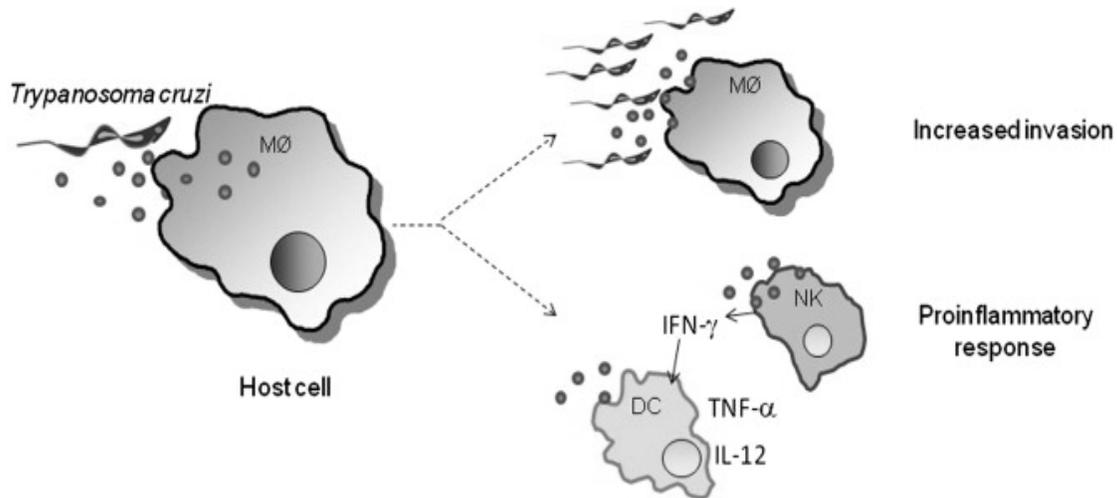
El estudio de estos sARNs circulantes será de relevancia para nuestro proyecto principalmente por el modelo de estudio con el que trabajamos. La comunicación parásito-parásito y parásito-célula huésped es un tema de relevancia cuando trabajamos en el campo de enfermedades parasitarias. Con respecto a esto eran pocos los estudios realizados sobre microvesículas de secreción al momento de comenzar con nuestro proyecto, hoy en día ya hay algunas publicaciones sobre microvesículas y tripanosomátidos y algunos de sus resultados se resumirán a continuación. Por otro lado, con lo que respecta a los sARNs circulantes, todavía no existe ningún trabajo que demuestre su presencia en *T. cruzi*. Nuestro trabajo sería el primero en intentar dilucidar las poblaciones de sARNs que están siendo secretadas por *T. cruzi* y su relevancia biológica.

### 1.11 Microvesículas y *T. cruzi*.

Con respecto a microvesículas y tripanosomátidos, el tema se puede rastrear hasta finales de los años '70, cuando investigadores trabajando con *T. cruzi* en microscopia electrónica de transmisión eran capaces de observar la presencia alrededor del cuerpo del parásito de estas vesículas membranosas, sin poder explicar su origen, pero indicando su posible relevancia por ejemplo en la movilidad de anticuerpos y otras proteínas de membrana (Schmunis et al. 1980). Pero los primeros reportes donde se asocian la secreción de vesículas membranosas y antígenos de superficie, surge del grupo de Walter Colli, a principios de los '90, donde muestran micrografías electrónicas donde se observa que las microvesículas estarían siendo liberadas a partir de la membrana plasmática del cuerpo del parásito y de la zona del bolsillo flagelar (Goncalves et al. 1991). A partir de ahí muchos estudios surgen sobre el análisis de diferentes proteínas relevantes como antígenos que están siendo secretadas al medio por *T. cruzi*, pero no se vuelve a hablar de vesículas hasta el 2009 con el trabajo de Torrecilhas y colaboradores. En el mismo los autores destacan la relevancia de las vesículas secretadas por las formas infectivas de *T. cruzi* en la respuesta inflamatoria de su huésped (Trocoli Torrecilhas et al. 2009).

En el 2012 Torrecilhas y colaboradores (Torrecilhas et al. 2012) publican una revisión donde destacan el rol de las vesículas de secreción como portadores de factores de virulencia en diferentes enfermedades parasitarias causadas por protozoarios. En este trabajo proponen que las vesículas de secreción podrían estar actuando como mensajeros para favorecer la invasión por el parásito de la célula huésped. Esto podría llevarse a cabo de diferentes maneras (como se muestra en la **Figura 11**), ya sea por su interacción con moléculas de la superficie celular que desencadenaran ciertos acontecimientos o por su internalización al citoplasma (Torrecilhas et al.

2012). De cualquier forma representa un mecanismo novedoso de interacción entre huésped-parasito que merece ser estudiado con más detalle. Una de las hipótesis es que *T. cruzi* usa este tipo de estrategias para liberar grandes cantidades de componentes necesarios para su adhesión e invasión celular, así como para evadir los mecanismos de defensa del huésped, para prepararlo para la infección de nuevos parásitos (Torrecilhas et al. 2012). En resumen el estudio de este tipo de interacciones puede ser de relevancia en el diagnóstico, pronóstico e inmuno-profilaxis de este tipo de enfermedades parasitarias.



**Figura 11: Se muestra un esquema de alguno de los roles conocidos para las vesículas secretadas por *T. cruzi*.** Las mismas pueden actuar como factores de virulencia preparando al celula huésped para la invasión parasitaria, o generando una respuesta pro-inflamatoria en la misma que beneficie de alguna forma la progresión de la infección. Modificado de (Torrecilhas et al. 2012)

A principios de este año surgen tres trabajos que revisan nuevamente la relevancia de las microvesículas secretadas por protozoarios parásitos en el desarrollo de la infección. Por un lado Inal y colaboradores (Inal et al. 2013) destacan la capacidad de *T. cruzi* para estimular la producción de microvesículas en diferentes tipos celulares como respuesta a su co-cultivo. Siendo esta una nueva forma de ver la respuesta del huésped produciendo microvesículas como estímulo del parásito. Por el otro lado, Deolino y colaboradores (Deolino et al. 2013) desarrollan experimentos usando diferentes marcadores lipofílicos para seguir las microvesículas secretadas tanto por el parásito como por la célula huésped y revelan que pueden ocurrir eventos de fusión de ambos tipos de vesículas. Esto sería otro aspecto interesante que podría tener importancia de la generación de microvesículas como respuesta al parásito en la comunicación inter-celular que ya veníamos mencionando. El tercer trabajo es del grupo de Igor Ameida, en el cual realizan un análisis proteómico de las microvesículas secretadas y de las proteínas solubles liberadas al medio por *T. cruzi*. En el mismo, describen la existencia de dos poblaciones bien diferenciadas por tamaño y contenido que están siendo secretadas por epimastigotes y

tripomastigotes de *T. cruzi*. También revelan una gran lista de proteínas secretadas solubles con potencial rol en al patogénesis de la enfermedad (Bayer-Santos et al. 2013). Estos resultados proveen información relevante del contenido proteico del secretoma de *T. cruzi* y de los diferentes componentes del mismo.

#### HIPOTESIS:

En el contexto desarrollado anteriormente, proponemos que los sARNs derivados de ARNt en *T. cruzi* representan una vía ancestral o primitiva de regulación por sARNs con un rol relevante en la biología del parásito y en la relación con su huésped mediante sistemas de comunicación intercelular mediada por microvesículas.

#### 1.11 OBJETIVOS GENERALES

Mediante el presente proyecto se pretendió describir una nueva vía de regulación de la expresión génica en base a estos fragmentos derivados de ARNt en el parásito *T. cruzi*. Pretendimos identificar que tipos de proteínas interaccionan con estos fragmentos derivados de ARNt, principalmente enfocándonos en un miembro de la familia de proteínas Argonauta estudiadas en nuestro laboratorio. Procuramos responder preguntas sobre la función o significado biológico de estas moléculas. Esto aportaría nuevos conceptos en la regulación de la expresión génica en parásitos protozoarios del hombre como *T. cruzi* y en la biología molecular en general.

A esto hay que agregar resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo que demuestran la posible presencia de diversas moléculas de ARN en el sobrenadante de cultivo de *T. cruzi*, dentro de las cuales se ha podido identificar ARNt y fragmentos derivados de los mismos. En el presente trabajo se busco poder caracterizar y elucidar el rol biológico de estos fragmentos de ARNt que son secretados y que pueden tener un posible rol en la comunicación inter-celular en estos organismos unicelulares.

## 1.12 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar el clonado y secuenciado de las poblaciones sARNs presentes en la forma tripomastigote metacíclico de forma de poder realizar un estudio comparativo con la forma epimastigote y ver si las mitades de ARNt son relevantes también en el estadio infectivo.
- Con respecto a la proteína TcPIWI-tryp, se pretende realizar ensayos de inmunoprecipitación y secuenciación de las posibles moléculas de ARN unidas a la misma. Se pretende llevar a cabo ensayos de sobre-expresión en *T. cruzi* de la misma, así como su posible *knock out*.
- Se pretende poder caracterizar los gránulos citoplasmáticos formados por mitades de ARNt mediante microscopia electrónica de transmisión y FISH.
- Purificar la fracción de microvesículas secretadas al sobrenadante de cultivo de *T. cruzi*. Con estas fracciones se procedió a realizar ensayos de transcriptómica para caracterizar los posibles sARNs circulantes en *T. cruzi*.
- En colaboración con el Dr. Wanderley de Souza de la UFRJ, se intentó caracterizar el contenido proteico y transcriptómico de microvesículas de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* Y y CL-Brener de manera de comparar diferentes cepas a nivel de secretoma.
- Se busca poder dilucidar un posible rol biológico para las mitades de ARNt de *T. cruzi* y para las microvesículas secretadas y su contenido en el propio parásito y en su célula huésped.

## 2. Materiales y Métodos

2.1 Cultivo de *T. cruzi* Dm28c y líneas celulares usadas.

2.2 Clonado de sARNs en metacíclicos.

2.3 Inmunoprecipitación de TcPIWI-tryp y Clatrina. Secuenciado masivo de sARNs co-inmunoprecipitados con TcPIWI-tryp

2.4 Northern blot, Western blot y RT-PCR para mitades de ARNt.

2.5 Inmunofluorescencia y FISH, adquisición y análisis de imágenes.

2.6 Marcado de parásitos y Ensayos de transwells.

2.7 Purificación de microvesículas secretadas por *T. cruzi*, secuenciado masivo de sARNs y proteómica de su contenido.

2.8 Microscopía electrónica

2.9 Ensayos de metaciclogenesi promovidos por microvesículas. Uso de Dynasore.

2.10 Ensayos de microarreglos con células HeLa co-cultivadas con microvesículas o sondas para mitades de ARNt.

2.11 Transformación de células K562 con el contenido de microvesículas y ensayos de infección con *T. cruzi*.

- Medios y soluciones en general.

### 2.1 Cultivo de *T. cruzi* Dm28c y líneas celulares usadas.

Para este trabajo se usaron epimastigotes de *T. cruzi* clon Dm28c (Contreras et al. 1988), los mismos fueron cultivados a 28°C en medio axénico “liver infusion tryptose” (LIT) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor hasta fase exponencial temprana, por medio de pasajes semanales.

Para la obtención de tripomastigotes metacíclicos se procedió con ensayos de metaciclogénesis “*in vitro*” bajo condiciones químicas definidas y previamente descriptas por (Bonaldo et al. 1988).

Se usaron las siguientes líneas celulares:

Línea epitelial de cáncer cérvico-uterino humano (células HeLa).

Línea epitelial de riñón de mono verde (células Vero).

Línea linfoblástica derivada de medula ósea humana de un paciente con Leucemia Mieloide Crónica (células K562).

Las mismas se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 10% de SBF y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 mg/ml) a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> con pasajes cada 3 días o realizando cambios de medio necesarios para su mantenimiento.

### 2.2 Clonado de sARNs en metacíclicos.

Para el clonado de sARNs se procedió como se describe en Pfeffer et al. (Pfeffer et al. 2003) con algunas modificaciones y en (Garcia-Silva et al.

2010) para epimastigotes. Se partió de una muestra de 800 µg de ARN total de parásitos extraído con TRIzol (Invitrogen) siguiendo protocolo recomendado por el fabricante, de tripomastigotes metacíclicos obtenidos por el método de metaciclogenesis descrito en (Contreras et al. 1988). Los sARNs entre 18 y 32 nt fueron seleccionados y purificados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15%. Fueron usados marcadores moleculares de ADN para identificar las bandas del tamaño deseado las cuales fueron cortadas siguiendo la movilidad del marcador de ADN teñido con Bromuro de Etidio.

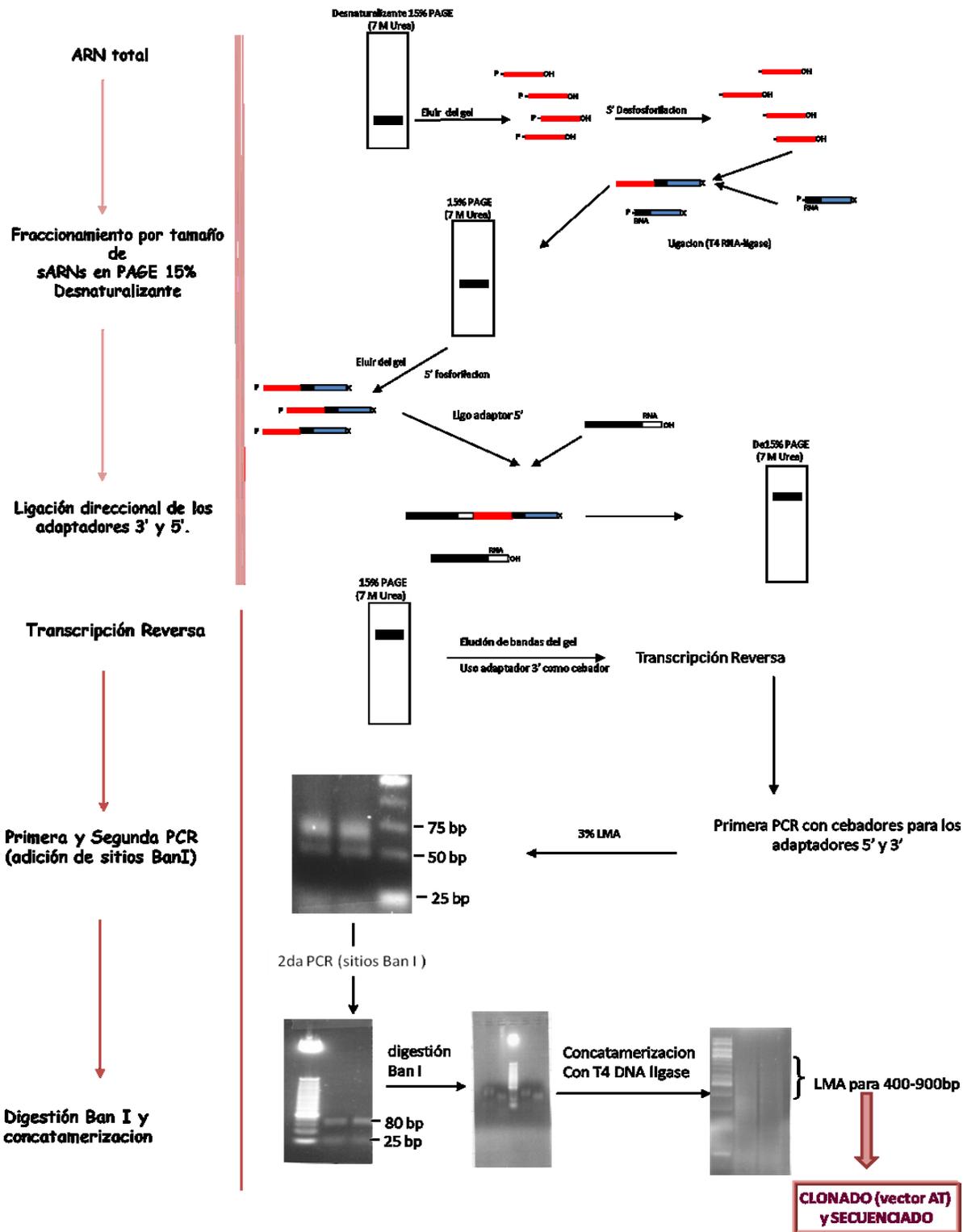
Luego se procedió con la ligación de adaptadores 5' y 3' que contienen el sitio de restricción Ban I a los sARNs purificados y su amplificación por PCR, la muestra fue digerida con Ban-I y los productos fueron concatamerizados y clonados en el vector pGEM T-easy (Promega Corp., Buenos Aires, Argentina) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En la **Figura 12** se muestra un esquema del protocolo seguido para el clonado.

Se realizó un “*screening*” por PCR de las colonias obtenidas usando los primers de secuenciado M13. Los productos obtenidos en estas PCRs que superaban los 500nts o las minipreparaciones de ADN plasmídico realizado con esas colonias fueron directamente sometidos a secuenciado. El análisis de secuencias y búsquedas en el BLAST fueron realizadas usando la información obtenida de bases de datos del

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>),

GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi/index.jsp>)

y TcruziDB (<http://tcruzidb.org/tcruzidb/>).



**Figura 12: Esquema de clonado de sARNs realizado en el presente trabajo.** Se muestran los diferentes pasos del protocolo partiendo del ARN total hasta el secuenciado de los clones obtenidos. Una descripción más detallada del protocolo se encuentra en el texto.

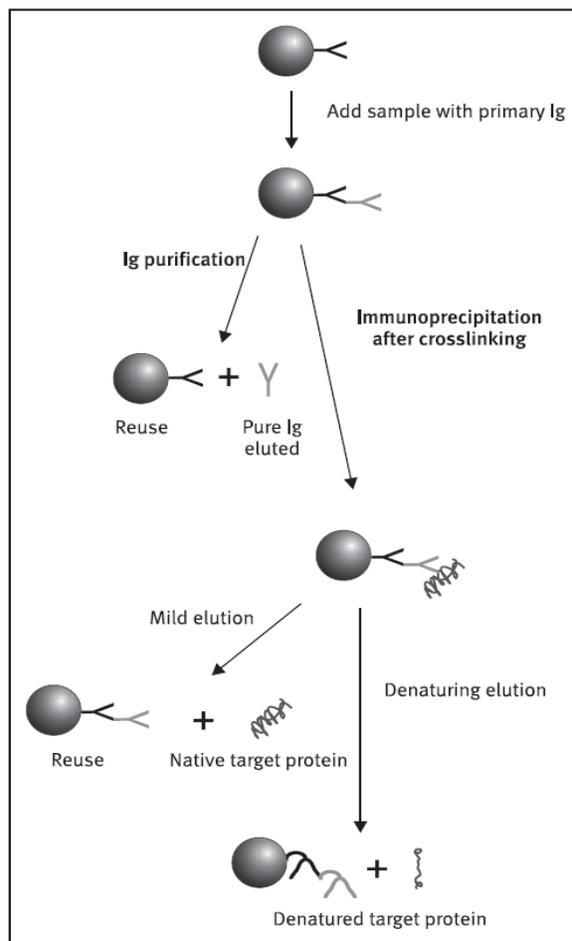
## 2.3 Inmunoprecipitación de TcPIWI-tryp y Clatrina.

### Secuenciado masivo de sARNs co-inmunoprecipitados con TcPIWI-tryp.

Se obtuvieron aproximadamente  $1.10^9$  parásitos epimastigotes en fase estacionaria de crecimiento del medio de cultivo para TcPIWI-tryp y estresados por 48 horas en RPMI sin SBF para Clatrina, mediante centrifugación (3000g durante 8 min). Fueron lisados con un tampón hipotónico de lisis (50 mM Tris a pH 8.0, 100 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, cocktail inhibidor de proteasas (Roche)) de manera tal que no se lisaran los núcleos ya que nos interesaba la fracción citoplasmática. La lisis de los parásitos se realizó incubando a estos mismos durante 2 horas a 4°C con el buffer de lisis, en agitación, luego se centrifugó durante 20 min a 7000g a 4°C. La cuantificación proteica se utilizó el reactivo BCA (Sigma), siguiendo el protocolo del fabricante.

Para realizar la inmunoprecipitación de ambas proteínas se utilizaron esferas magnéticas, Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG y/o anti-Mouse IgG (Invitrogen). Un esquema general del uso de estas esferas se muestra en la **Figura 13**. Previo a la incubación con los anticuerpos específicos con el extracto proteico se realizó un “crosslinking” entre nuestro anticuerpo y los anticuerpos unidos a las esferas magnéticas.

Comenzamos realizando 2 lavados con PBS 1X a 200µl de esferas magnéticas, se incubaron en 500µl de tampón de lisis durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente se incubo las esferas en 500µl de tampón de lisis con 5µl de anticuerpo específico, 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Luego de las 2 horas se lavo las esferas con 100µl con tampón de lisis y un lavado con PBS 1X. Posteriormente se realizó 1 lavado con 200µl de HEPES 20mM, pH 7,5 y 20µl de Glutaraldehído 2,3% recién preparado, durante 5 min a 37°C y 1 lavado durante 5min en HEPES 20mM pH 7,5 a temperatura ambiente, realizando estos dos últimos pasos por



**Figura 13. Esquema de inmunoprecipitación usando Dynabeads (Invitrogen).**

triplicado. Consecuentemente se realizaron 2 lavados con 50µl de tampón de parada (Tris-HCl, pH 8, 1M), 5min a temperatura ambiente cada uno. Una vez realizado el “*crosslinking*” se prosiguió con la inmunoprecipitación. Se incubó 30 µg de extracto proteico con las esferas magnéticas *overnight* a 4°C. Luego la fracción que no se unió (fracción no unida) se guardó como control, a continuación las esferas se lavaron 3 veces con 1ml de tampón de lisis, guardando también estos 3 lavados como control. Por último se eluyeron las proteínas con 100µl de glicina 0,2M pH 2,5 durante 5 min en agitación y se les ajusta el pH con 10µl de Tris-HCl 0,5M pH 9,5.

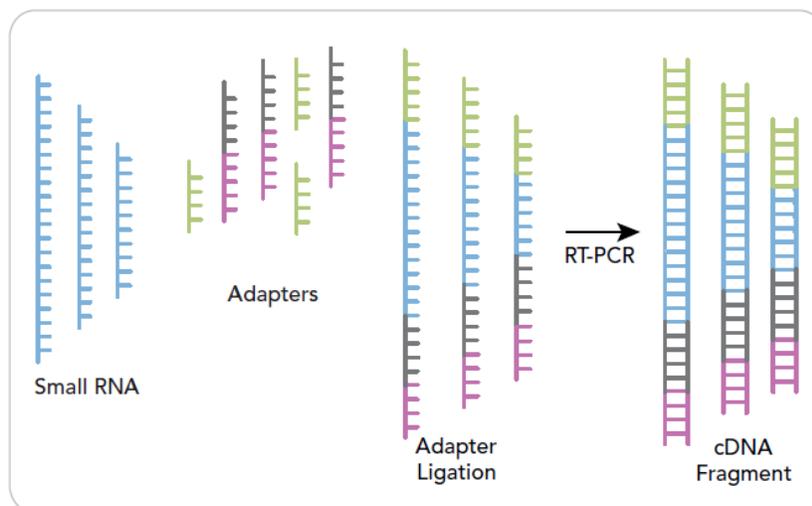
Como controles de especificidad se realizaron los mismos ensayos que con los anticuerpos específicos usando Igs anti-Rabbit y anti-Mouse.

La extracción de proteínas y del ARN de la fracción unida a las esferas magnéticas durante la inmunoprecipitación se realizó con el reactivo TRIzol (Invitrogen). La visualización de las proteínas inmunoprecipitadas y su comparación con la fracción no unida, los lavados y los extractos totales se realizó mediante una electroforesis SDS-PAGE (desnaturalizante) con un gel al 8% y posterior tinción con plata mediante la utilización del Kit “SilverQuest” de Invitrogen.

Se prosiguió con la validación del protocolo usado mediante *Western Blot* de las fracciones obtenidas con los anticuerpos específicos. Se separaron las proteínas mediante electroforesis utilizando un gel de acrilamida 8% desnaturalizante. Luego se realizó la transferencia de las proteínas del gel hacia una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) mediante transferencia eléctrica durante 4 horas a 300mA. Se realizó el bloqueo de la membrana, incubándola con PBS-BSA 5% a 37°C durante 1 hora 30min u *overnight* a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X- Tween 0,1% durante 5 min cada uno en agitación, seguido de esto se incubó la membrana con el anticuerpo primario, anti-TcPIWI-tryp 1/2000 o anti-Clatrina 1/1000, en BSA 2%, Tween 0,1%, PBS 1X, durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego de la incubación con el anticuerpo se lavo 3 veces la membrana con PBS-Tween 0,1% durante 5 min cada uno y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo o anti ratón conjugado a peroxidasa (DAKO) usado en una dilución 1:10.000 en PBS-BSA 2%, Tween 0,6%. Por último se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,6%. Una vez unido el secundario se procedió con el revelado de la membrana utilizando el reactivo ECL (VIVO Science), se expuso la membrana a un film (High Performance Quimioluminiscencia Film, GE), variando el tiempo de exposición de acuerdo a la señal obtenida.

A partir del ARN obtenido de la extracción con TRIzol (Invitrogen) se corrieron las muestras en un gel de acrilamida desnaturalizante al 15%, urea 7,5M, utilizando para la corrida buffer TBE 0,5X (Tris-Borate-EDTA). Luego se tiñó el gel con SYBR-Gold (Invitrogen) para la visualización del ARN. La visualización del ARN en el gel nos permitió la identificación de una población de pequeños ARN (15-30nt). Dicha fracción del gel fue cortada y eluida del gel. La elución del ARN se realizó incubando los cortes de gel en 2 volúmenes de NaCl 0,3M *overnight* a 4°C en agitación y luego agregando al sobrenadante 3 volúmenes de etanol absoluto *overnight*.

Para el envío del ARN a secuenciado masivo luego de la elución de los sARNs se resuspendió en Etanol absoluto, NaCl 0,3M, 1µl de glicógeno y 1µl de RNasa Out (Sigma). Para realizar el secuenciado masivo de los sARNs inmunoprecipitados se realizaron librerías de ADNc como se muestra en la **Figura 14**, siguiendo protocolo recomendado para secuenciado de librerías de sARNs en Illumina Solexa: NEBNext®Multiplex Small RNA Library Prep Set. Brevemente, se realizó la ligación de los adaptadores 5' y 3' a los sARNs. Una vez ligados los adaptadores para obtener el ADNc se realizó una retro-transcripción y para la amplificación de los mismos se realizó una PCR. Para la PCR se utilizó primer complementarios a los extremos de los adaptadores. Seguidamente se purificó el ADNc obtenido mediante una corrida electroforética y por último se valido la librería midiendo la pureza de la muestra y su concentración por *Bio-Analyzer*. Una vez obtenidas las muestras se realiza la reacción de secuenciación en un equipo Genome Analyzer II.



**Figura 14. Esquema ilustrativo del protocolo de secuenciado masivo de sARNs con Illumina Solexa 1.9.**

El análisis de las secuencias obtenidas fue realizado por el Dr. Oscar Franzen del Mount Sinai Hospital, NY, USA. Básicamente, las secuencias obtenidas fueron cortadas y limpiadas de los adaptadores y alineadas con el genoma de *T. cruzi* CL Brener usando bowtie v.2.0.0-beta6 (permitiendo el error en una base).

## 2.4 Northern blot y RT-PCR para mitades de ARNt.

Para los ensayos de *Northern blot* para sARNs un total de 30  $\mu\text{g}$  de ARN total fue sembrado en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 15% y corridos en 0.5x Tris-Borate-EDTA (buffer de corrida). Antes de la transferencia los geles son teñidos con Bromuro de Etidio para verificar que los niveles de carga de ARN fueron iguales y que la corrida fue buena. El ARN fue transferido electroforéticamente a membranas GeneScreen Plus (Schleicher and Schuell, NH, USA). Después de la transferencia el ARN es fijado a la membrana por *cross linking* con UV a 120 mJ y calentadas a 80 °C por 30 min. Las sondas de oligonucleótidos fueron generadas mediante el marcado 5' con la T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs, Beverly, MA) utilizando [ $^{32}\text{P}$ ]  $\gamma$ -ATP (7000ci/mmol; 10 mCi/ml, ICN-biomedicals). La sonda se purificó de las que no incorporaron marcación mediante columnas G-25 MicroSpin (Amersham Pharmacia). Las membranas fueron pre-hibridados por 2hrs a 40°C en buffer church modificado (Fosfato de Sodio 0.25M pH 7.2, 5% SDS, 0,5% albúmina bovina, 1mM EDTA). Posteriormente se adicionaron las sondas radiactivas y se incubó por 1hr a 42°C. Las membranas fueron lavadas a 42°C 2 veces con SSC 2x, 0,1 % SDS por 20 min., 1x SSC 0,1 % SDS por 20 min. y 0,5x SSC 0,1% SDS por 20min. Las membranas hibridadas fueron expuestas toda la noche en películas de rayos X (Kodak Biomax MS X-ray films). Para la reutilización de las membranas, las sondas hibridadas fueron eliminadas mediante dos lavados en agua desionizada caliente 0,1% SDS durante 15 min y re-hibridadas hasta cuatro veces, hasta que la señal específica fue débil para ser detectada.

Para los ensayos de RT-PCR para mitades de ARNt, se fraccionaron en geles de poli-acrilamida 15% denaturantes UREA 7.5M, 20 $\mu\text{g}$  de ARN obtenido después de la inmunoprecipitación. Se eluyeron los sARNs entre 20 y 60 nts del gel y se sometieron a transcripción reversa empleando el kit miScript (Qiagen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se procedió con la amplificación del material usando cebadores Universales reversos que reconocen el adaptador 3' ligado en la transcripción reversa y cebadores-LNA (Exiqon) directos específicos. Los cebadores específicos-LNA (Locked Nucleic Acids), permiten el uso de temperaturas de apareamiento manejables en las PCRs usadas corrientemente en el laboratorio. Los cebadores específicos usados se encuentran detallados en la sección **Material Suplementario 1: Sondas de ARN y ADN, oligonucleótidos y anticuerpos usados**. La amplificación del material de llevó a cabo con 40 ciclos de 15'' a 95°C y 50'' a 56°C. Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en geles poliacrilamida 15% PAGE teñidos con SYBRGold (Invitrogen). En todos los casos, la identidad de los productos amplificados fue verificada mediante secuenciado.

## 2.5 Inmunofluorescencia y FISH, adquisición y análisis de imágenes.

Para los ensayos de FISH se usaron parásitos en los diferentes estadios y bajo condiciones de stress nutricional y/o líneas celulares. Las células fueron luego fijadas con 4% paraformaldehído en PBS por 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se incuban en 25 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por 10 min. Posteriormente se adhieren a las láminas (previamente tratadas con poly-lisina) por 20 min a temperatura ambiente y luego de realizar 2 lavados con PBS las células fueron permeabilizadas con 0.2% Triton X-100 en PBS por 5 min. Las láminas son bloqueadas y pre-hibridadas por 2 h a temperatura ambiente en 2% BSA, 5X Denhardt, 4xSSC y 35% formamida deionizada (Solución de Hibridación). La hibridación fue hecha durante 14 horas (*overnight*) en cámara húmeda en la presencia de  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  del oligonucleótido correspondiente conjugado ya sea con isothiocianato de fluoresceína (FITC) o cianidina (Cy3). Cuando se indica los ensayos de FISH fueron realizados bajo condiciones de desnaturalización por el calentamiento de las láminas a  $75^\circ\text{C}$  por 5 min previo al paso de hibridación con la sonda elegida. Después de la hibridación las láminas son lavadas una vez con 2xSSC con 50% de formamida deionizada, una vez en 2xSSC, se incubó 10 min en 1xSSC con  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), y se siguió con dos lavados en 0,5X SSC. Las láminas fueron montadas en  $5 \mu\text{l}$  de Fluor Save Reagent (DAKO).

Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta con los diferentes anticuerpos los parásitos son tratados de la misma manera que para FISH. Luego de permeabilizados las láminas son incubadas una hora con la dilución del anticuerpo correspondiente en PBS-BSA 5%, luego son lavados 2 veces con PBS-tween 0,1%. Los anticuerpos conjugados con TRITC (1/1000) o FITC (1/50) (DAKO) secundarios fueron incubados 1h con PBS-BSA 5% y lavados 2 veces con PBS-tween 0,1% y 2 veces con PBS. Las láminas fueron montadas igual que para los ensayos de FISH. Para los ensayos de inmunofluorescencia acoplada con FISH primero se realizó el ensayo de FISH, luego de los lavados de la sonda las células son fijadas nuevamente con 4% paraformaldehído en PBS por 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y son incubadas en 25 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  por 10 min. Posteriormente se sigue con el ensayo de inmunofluorescencia.

Como controles de especificidad de la señal en los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se hacen laminas en las mismas condiciones que las anteriores pero se incubó con suero pre-inmune, otra con sólo anticuerpo secundario, otra con inmunoglobulinas de conejo y una última donde se realizó una co-incubación del anticuerpo específico con exceso de proteína recombinante.

Las láminas fueron observadas usando un microscopio de epifluorescencia Olympus IX 81 acoplado con una cámara digital Hamamatsu Orca-ER (Diagnostic Instruments) y

microscopio confocal Leica TCS SP5 cuando se indica. Las imágenes montadas (“merged”) son obtenidas por la imposición de las imágenes individuales.

Para el marcado de membrana plasmática se usó Cell Mask Orange (Invitrogen) 1/500 incubando a 37°C por 30 minutos antes de proceder con el fijado de la muestra.

## 2.6 Marcado de parásitos y Ensayos con *transwells*.

Estos ensayos con *transwells* fueron diseñados para verificar la eventual transferencia del contenido de microvesículas de un parásito a otro o de parásitos a sus células huésped. Primero se marcaron los parásitos de la siguiente manera: Se usaron  $1.10^9$ .ml<sup>-1</sup> epimastigotes en fase estacionaria tardía de crecimiento. Se transformaron con oligoribonucleótidos sintéticos marcados en 5' con Cy3 y modificados químicamente (IDT Inc. IA, USA) para evitar su degradación por ribonucleasas celulares (extremos con puentes fosforothioato y ribonucleotidos 2' O-metilo). Se resuspendieron los parásitos en 0.4 mL of Hepes Buffer Solution (HBS: Hepes 21 mM, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, glucosa 6 mM pH 7.4) y se electroporaron en cubetas de 0.4 cm en la presencia de 100 nM de la sonda usada. Se usó un equipo de electroporación ECM-600 Electroporation System (BTX CA, USA). Los parásitos fueron sometidos a 2 pulsos de 450 V/ 500  $\mu$ F y se dejaron en recuperación por 24 horas en LIT 10% SBF antes de usarlos para los experimentos. Como controles se usaron parásitos en las mismas condiciones pero no electroporados expuestos a sonda libre en el medio de forma de excluir la posible incorporación natural de la sonda. Estos parásitos control fueron monitoreados hasta 24 horas sin observarse evidencias de señales fluorescentes detectables.

Para los ensayos de intercambio parásito-parásito se incubaron en *transwells* (0.4 y 1  $\mu$ m de tamaño de poro HTS Transwell-24, Corning Inc.), en la cámara inferior:  $2.10^6$  de epimastigotes no marcados estresados por 48 horas en RPMI, en 1 mL de RPMI-1640; mientras que en la cámara superior: se cargaron  $2.10^6$  de epimastigotes marcados estresados por 48 horas en RPMI, en el mismo medio.

Para los ensayos de intercambio parásito-célula huésped susceptible se incubaron en los mismos *transwells*, en la cámara inferior:  $2.10^5$  células Vero y/o HeLa en 1 mL del mismo medio; y en la cámara superior las mismas condiciones que para el ensayo parásito-parásito.

Las placas de *transwell* fueron incubadas a 28°C por 24 h. La transferencia de las sondas marcadas y de su señal fluorescente de la cámara superior a la inferior fue monitoreada por microscopía de epifluorescencia.

Para los tratamientos con Cicloheximida para inhibir síntesis proteica: se incubaron  $2.10^5$  células HeLa con  $50\mu\text{g/mL}$  de cicloheximida (Sigma) por 3 horas, luego se procedió con ensayo de *transwell* descrito anteriormente.

Para los tratamientos con Puomicina para inhibir la traducción de proteínas: se incubaron  $2.10^5$  células HeLa con  $20\mu\text{g/mL}$  de Puomicina (Sigma) por 4 horas, luego se procedió con ensayo de *transwell* descrito anteriormente.

## **2.7 Purificación de microvesículas secretadas por *T. cruzi*, secuenciado masivo de sARNs y proteómica de su contenido.**

Para la purificación de grandes cantidades de microvesículas secretadas por *T. cruzi*, para su posterior análisis y usos en diferentes ensayos, se procedió de la siguiente manera:

Se colectó el sobrenadante de cultivo de  $1.10^{11}$  epimastigotes de *T. cruzi* mantenidos por 48 horas en medio RPMi sin SBF (100mL). Se realizó una primera centrifugación a 2000 g por 15 min para eliminar las células remanentes. El sobrenadante de esta centrifugación a 2000 g se colectó y se centrifugó 2 veces a 15,000 g a  $4^\circ\text{C}$  por 30 min para remover los restos celulares y grandes microvesículas como cuerpos apoptóticos, por ejemplo. El sobrenadante de la centrifugación a 15,000 g se ultracentrifugó a 110,000 g  $4^\circ\text{C}$  por 70 min de manera de obtener en el *pellet* las microvesículas. El *pellet* de microvesículas se lavó una vez en PBS 1X y se ultracentrifugó nuevamente a 110,000 g por 1 h.

El protocolo de purificación de microvesículas utilizado se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión como se indica a continuación. La cuantificación de microvesículas obtenidas se hizo mediante la determinación de la concentración proteica total del *pellet* obtenido por el método de Bradford (Pierce).

Mediante este método se determinó que la producción de microvesículas en cantidad proteica usando este protocolo de purificación era de aproximadamente  $1.2\ \mu\text{g}$  por  $1.10^{10}$  parásitos usados.

Para la comparación del contenido de microvesículas secretadas por diferentes cepas de *T. cruzi* se usaron microvesículas purificadas de tripomastigotes de *T. cruzi* clon CL-Brener y cepa Y. Para ello se colectaron tripomastigotes mantenidos en cultivo mediante la infección en células VERO y se incubaron  $1 \times 10^8$  parásitos/mL 2 horas en PBS 1X (medio de secreción). Posteriormente se procedió como se indica arriba para la purificación de microvesículas secretadas por centrifugación diferencial y ultracentrifugación.

A continuación se extrajo el ARN total contenido en el *pellet* de microvesículas obtenido usando TRIzol (Invitrogen) y siguiendo instrucciones del fabricante. Dependiendo la muestra se obtuvieron concentraciones que variaron entre 100-500ng/mL de ARN siguiendo el protocolo descrito. Se procedió con la preparación de las librerías para sARNs de la misma manera que se detalla en la sección 2.3 para el inmunoprecipitado de TcPIWI-tryp. El secuenciado se realizó usando el mismo equipo Genome Analyzer II (Illumina Inc.).

El análisis de las secuencias se llevo a cabo por Lic. Tamara Fernández de la Unidad de Bioinformatica del Institut Pasteur de Montevideo y por el Dr. Oscar Franzen del Mount Sinai Hospital, NY, USA, para las microvesículas de tripomastigotes. Brevemente se eliminaron las secuencias de adaptador de las lecturas usando Python y las lecturas menores a 16 nts. Las secuencias se alinearon con el genoma *T. cruzi* CL Brenner (Esmeraldo y No Esmeraldo) usando el programa Novoalign V2.07.08 (<http://www.novocraft.com>). La clasificación en clases funcionales de las lecturas se realizó de acuerdo a las anotaciones de la base de datos TriTrypDB.

El estudio proteómico del contenido de microvesículas purificadas de tripomastigotes de *T. cruzi* Brener e Y se realizó en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo por el Dr. Carlos Batthyány. Brevemente, se resuspendió el pellet de la ultracentrifugación en 100 µl de H<sub>2</sub>O y se tripsinizó con 1 µg de Tripsina, 18 horas a 37°C. Se continuó con Protocolo de nLC-nSI-trampa ionica (LTQ) usado en la unidad.

## 2.8 Microscopía electrónica.

### Microscopía Electrónica de Barrido:

Los parásitos a analizar son lavados dos veces con PBS 1X y fijados por 1 hora con 2.5% glutaraldehído (GA) en 0.1 M de tampón cacodilato (pH 7.2), 5mM Cloruro de Calcio y 2% de sacarosa. Las células son lavadas con el mismo tampón y adheridas a cubreobjetos tratados previamente con 0.1% poly-*L*-lisina (M.W. 70,000, Sigma-Aldrich Co.). Luego se realiza una post-fijación por 15 min con 1% de Tretroxido de Osmio (OsO<sub>4</sub>), 0.8% ferrocianuro de potasio y 5 mM de Cloruro de Calcio en tampón cacodilato 0.1M (pH 7.2), las células son lavadas, deshidratadas en concentraciones crecientes de Etanol y secadas a punto crítico con CO<sub>2</sub>. Las células son adheridas a talones de microscopía electrónica de barrido, cubiertas con una capa de 20-nm-de grosor de oro y observadas en un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 250 a 25 kV.

### **Microscopía Electrónica de Transmisión.**

*Análisis de Rutina:* Las muestras (parásitos y células huésped) fueron lavadas dos veces en PBS 1X y fijadas por 1 hora a temperatura ambiente en 2.5% glutaraldehído (GA) en 0.1 M de tampón cacodilato (pH 7.2), 5mM Cloruro de Calcio y 2% de sacarosa. Todas las muestras fueron post-fijadas con 1% de OsO<sub>4</sub>, 0.8% ferrocianuro de potasio y 5 mM de Cloruro de Calcio en tampón cacodilato 0.1M (pH 7.2) por 1 h a temperatura ambiente y deshidratadas en concentraciones graduales crecientes de acetona. Posteriormente fueron embebidas en PolyBed812 (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA), y polimerizadas por 3 días a 60°C. Las secciones ultrafinas obtenidas con un ultra micrótomo Leica (Nussloch, Germany) fueron teñidas con acetato de uranilo en citrato de sodio.

*Tinción negativa para microvesículas:* Las microvesículas purificadas mediante el protocolo descrito anteriormente fueron adheridas a rejillas de cobre cubiertas por formvar/carbon por 10 minutos, fijadas en 4% formaldehído en 0.1M tampón cacodilato (pH 7.2) por 10 minutos a temperatura ambiente y lavadas en PBS. Las mismas se tiñeron con 2% de acetato de uranilo por 30 seg.

*Para el inmunomarcado* las rejillas con la muestra fueron bloqueadas luego de la fijación con 50 mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS por 5 minutos, lavadas e incubadas por 10 min en PBS, pH 7.2, 0.2% gelatina, 0.1% azida (PGN), y permeabilizadas con 0.1% saponina en PGN por 5 min. Las rejillas obtenidas fueron incubadas con anti-TcPIWI-tryp 1:500 o la cantidad equivalente de IgGs de conejo como control diluidos en PGN por 30 min, lavadas en PGN e incubadas nuevamente con anticuerpo secundario marcado con esferas de 10 nm de oro (Sigma-Aldrich Co.) por 30 min. Las muestras fueron lavadas con PGN.

*Para la hibridación in situ;* las muestras permeabilizadas fueron lavadas 2 veces con 2xSSC 50% formamida y pre-hibridadas por 20 minutos a temperatura ambiente en 2% BSA, 5X Denhardt, 4xSSC y 35% formamida deionizada (Solución de Hibridación). La hibridación fue llevada a cabo *overnight* a temperatura ambiente en cámara húmeda en la presencia de 1 ng.ml<sup>-1</sup> de sonda usada conjugada a Biotina. Al concluir con la hibridación, las muestras fueron lavadas 2 veces con 2xSSC 50% formamida, 1 vez con 2xSSC, 1 vez con 1xSSC, 1 vez con 0.5xSSC y 1 vez con 0.1xSSC e incubadas con ExtrAvidina-oro 20 nm (SIGMA) por 30 min. Luego de 2 lavados con 2xSSC las muestras fueron teñidas con 2% de acetato de uranilo por 30 seg.

### ***Inmunomarcado y Crioultramicrotomía.***

Después de la incubación con los anticuerpos específicos y control que se describen arriba, las muestras fueron incubadas con una dilución 1:50 del complejo anti-Rabbit IgG–Oro 10 nm (Sigma-Aldrich Co.) en RPMI libre de SBF y lavadas en RPMI sin SBF y una vez en PBS. Posteriormente fueron fijadas en 0.1% GA, 4% formaldehído en 0.1M tampón cacodilato

de sodio suplementado con 3.7% de sacarosa y 5mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.2) por 60 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron luego lavadas 3 veces en PBS, infiltradas en 10% de gelatina en 0.1M tampón cacodilato de sodio, cortadas en cubos de 1mm e infiltradas en 25% poly-vinilpirrolidona (PVP) en 2.3M de sacarosa *overnight* en frío. Luego de esto, las muestras son montadas en talones de crioultramicrotomía y congelados rápidamente mediante su inmersión en nitrógeno líquido. Las criosecciones fueron obtenidas bajo un rango de temperatura de -70 a -90 usando un Ultracut UCT crio-ultramicrotomo (Reichert). El material fue colectado en 2.3M de sacarosa en PBS y transferidas a rejillas de plata recubiertas con Formvar-carbón de 400 mallas y guardadas en PBS, pH 8.0, con 3% BSA.

Para la hibridación *in situ*, las muestras fueron lavadas 2 veces con 2xSSC 50% formamida, pre-hibridadas por 20 minutos a temperatura ambiente en solución de hibridación. La hibridación fue realizada con 1 ng.ml<sup>-1</sup> de sonda conjugada a Cy3 en solución de hibridación fresca *overnight* en cámara húmeda a 37°C. Luego se procedió con 2 lavados en 2xSSC 50% formamida, 2 veces en PBS e incubamos por 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-Cy3- mouse (1:100) en PBS, pH 8.0, 1.5% BSA y 0.01% Tween20. Las muestras fueron lavadas e incubadas por 1 h a temperatura ambiente con anti-mouse IgG-gold complex 10 nm (Sigma-Aldrich Co. - 1:100 dilution) en PBS, pH 8.0, 1.5% BSA y 0.01% Tween20. Al final se realizaron 2 lavados con PBS. Las rejillas con las muestras fueron embebidas en 3% polyvinil alcohol-acetato de uranilo (9:1).

Todas las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión FEI Morgagni F268 (Eindhoven, The Netherlands) operando a 80 kV.

## 2.9 Ensayos de metaciclogénesis promovidos por microvesículas. Uso de Dynasore.

Para observar el posible efecto biológico de las microvesículas en epimastigotes de *T. cruzi*, se realizaron ensayos de co-incubación de cantidades crecientes de microvesículas con el mismo número de parásitos.

Se cultivaron epimastigotes en fase estacionaria de crecimiento ( $4 \times 10^6$  parásitos/mL) por triplicado en placas de 12 pocillos en RPMI libre de SBF. Estos parásitos fueron expuestos a concentraciones diferentes de microvesículas por 4 días. Como control se usaron parásitos en la misma condición pero sin el agregado de microvesículas exógenas.

A las 24, 48 horas, 3 y cuatro días se tomaron alícuotas del cultivo y se observaron al microscopio las formas parasitarias. Al observarse un incremento en el número de formas metacíclicas en las muestras con microvesículas, se realizaron conteos del número absoluto de metacíclicos observados para cada tiempo y cada muestra por triplicado.

Con el objetivo de poder adjudicar el efecto observado al incremento de la incorporación de microvesículas por el parásito mediante la vía Clatrina-Dinamina usamos Dynasore (Sigma).

Se preparó solución de Dynasore (Sigma) 100mM en DMSO 1% y se usaron en los ensayos concentraciones desde 0 a 100 $\mu$ M de esta solución. Los ensayos para ver el efecto del tratamiento de la droga se realizaron de la misma forma que los ya descritos sin adición de Dynasore.

## 2.10 Ensayos de microarreglos con células HeLa co-cultivadas con microvesículas secretadas por *T. cruzi* y/o sondas de mitades de ARNt

- *Optimización de las condiciones de co-incubación de las microvesículas purificadas de T. cruzi con sus células huésped.*

Para la optimización de los ensayos comenzamos poniendo a punto el tiempo necesario de incubación de las microvesículas con las células HeLa de forma de observar el contenido de las primeras liberado en el citoplasma de las células receptoras. Para la determinación de este tiempo de incubación, se incubaron las células con microvesículas purificadas de *T. cruzi* por 5, 30 minutos, 2 y 24 horas. Luego de estos períodos de incubación, se lavaron las células dos veces con PBS y se procesaron según protocolo de FISH para mitades de ARNt de Asp y Glu. El resultado de la incorporación del contenido de las microvesículas se observó en microscopio de epifluorescencia.

Posteriormente procedimos con la determinación de la relación más adecuada microvesículas/ número de células huésped; para ello, se cultivaron  $0.5 \times 10^6$  células HeLa en cubre-objetos colocados en placas de 6 pocillos y se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de microvesículas. Se usaron 0, 40, 80, 160, 320 y 600 ng de microvesículas para los diferentes ensayos. Se incubaron por 2 horas (tiempo determinado por el método mencionado en párrafo anterior) a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Las células se sometieron a FISH como se mencionó anteriormente. Brevemente, se lavan las células dos veces con PBS, se fijan por 10 min con 4% paraformaldehído en PBS y se incuban por 10 min en 25mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Luego de algunos lavados con PBS se permeabilizan con 0.2% Triton X-100 en PBS por 5min, se bloquean por 2 h en BSA 2%, 5X Denhardt, 4X SSC y 35% formamida (solución de hibridación). Se deja hibridando toda la noche en cámara húmeda a  $37^\circ\text{C}$  con 100nM de la sonda a utilizar conjugada a Cy3. Luego se procede con los lavados en series de SSC, estas muestras se incubaron posteriormente con anti-Cy3 (Invitrogen) 1/1000 y se revelaron con anti-mouse TRITC (Invitrogen) 1/500. Se procedió con su tinción con DAPI y su montaje y observación en microscopio de epifluorescencia.

- *Transfección de mitades de ARNt en células HeLa.*

Se transfectaron células HeLa con sondas de oligoribonucleótidos sintéticos marcados detallados en **Material Suplementario 1**, para las mitades de ARNt Leu y Thr y sus correspondientes sondas controles “*shuffled*” en una concentración final de 20nM. Se usó

Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como agente para la transfección (2 $\mu$ L/mL en medio Opti-MEM (Invitrogen)).

Para la transfección, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante para células adherentes.

- **Ensayos de microarreglos**

- *Preparación de las muestras de ARN.*

- Para las células tratadas con microvesículas:

Se incubaron células HeLa con microvesículas secretadas por *T. cruzi* por 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación de esta incubación, se lavaron las células removiendo microvesículas remanentes y se adicionó medio RPMI nuevo. Las células se mantuvieron en cultivo y se recolectaron muestras para la extracción de ARN a las 6, 24 y 72 horas luego de la incorporación de las microvesículas. En paralelo se usaron células control cultivadas en medio sin microvesículas. Cada condición se hizo por triplicado.

- Para células transfectadas con lipofectamina y mitades de ARNt Leu y Thr:

Se transfectaron células HeLa con mitades del ARNt-Thr-FAM, ARNt-ThrControl-FAM, ARNt-Leu-Cy3 y/o ARNt-LeuControl-Cy3 y se recolectaron 24 horas post-transfección para la extracción de ARN. Las células control se trataron solamente con Lipofectamina.

Para la extracción de ARN, las células recolectadas para cada muestra se lavaron dos veces en PBS 1X y se incubaron en TRIzol (Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se procesó esta muestra con el kit Illustra RNAspin Mini Isolation kit (GE Healthcare), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se verificó la integridad y la calidad del ARN obtenido en un Nano LabChip en un Bioanalyzer System 2100 (Agilent Technologies).

Se procedió con la amplificación y marcado del material usando el kit Quick Amp Labeling Kit-one color (Agilent Technologies). Todas las muestras se marcaron con Cy3. El ARN marcado y amplificado se purificó con kit RNAeasy mini kit (QIAGEN) y se analizó en NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) para su cuantificación y control de eficiencia de marcado.

A continuación, se realizó la hibridación y lavado de los chips usando el kit Gene Expression Hybridization kit (Agilent Technologies) y el Gene Expression Wash Buffer kit (Agilent Technologies) respectivamente. El escaneo y los controles de calidad primarios se llevaron a cabo en un escáner High-Resolution C (Agilent Technologies).

Los resultados obtenidos fueron analizados por la Lic. Florencia Cabrera-Cabrera de nuestra Unidad, con el programa GeneSpring Multi-Omics Analysis software, version 12.1 (Agilent Technologies). Se usó el test ANOVA ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ) para el análisis estadístico y se filtraron los genes diferencialmente expresados por nivel de expresión, para el análisis de vías se utilizó el programa GeneSpring o la versión en línea disponible de DAVID(Huang da et al. 2009; Huang da et al. 2009).

Para la validación de los resultados obtenidos en los microarreglos se llevaron a cabo ensayos de qRT-PCR. Se realizó transcripción reversa de 1  $\mu\text{g}$  de ARN de cada muestra obtenida con la Transcriptasa reversa Super Script II (Invitrogen) y oligo-dT como cebador. Los cebadores utilizados se detallan en **Material Suplementario 1**, para los siguientes genes de interés: ATF3, LNX2, PRAME, DUSP6, CAXCL2 y GAPDH (para normalización). Los ensayos se llevaron a cabo en un equipo Illumina Eco Real-Time PCR System usando Universal SYBR Green Master FastStart de Roche. Se usó ANOVA como test para determinar diferencias significativas.

### **2.11 Transformación de células K562 con el contenido de microvesículas y ensayos de infección con *T. cruzi*.**

Para estos ensayos se usaron microvesículas marcadas con sondas de mitades de ARNt-Cy3. Para ello se tomaron 1,2  $\mu\text{g}$  de microvesículas purificadas y se resuspendieron en tampón HBS, se incubaron 10 minutos en hielo con 50  $\mu\text{M}$  de sonda marcada con Cy3 (ARNt AspGUC) de Integrated DNA Technologies (IDT). Se procedió con un pulso de 450 V, 1300  $\mu\text{F}$  y 13  $\Omega$  en un equipo BTX ECM 600® (BTX CA, USA). Posteriormente se incubaron a 37°C por 2 horas o a 4°C toda la noche para permitir su correcta recuperación.

Las células K562 fueron transformadas artificialmente con estas microvesículas marcadas con Cy3 mediante electroporación. Se usó el equipo ECM-600 Electroporation System (BTX CA, USA) para transfectar  $1.10^8$  células en cubetas de 0.4 cm con 1.2  $\mu\text{g}$  de microvesículas marcadas obtenidas como se detalló anteriormente. Se sometieron las células a dos pulsos de 350 V de 130 ms y se dejaron recuperar por 24 horas en RPMI-1640 con 20% SBF antes de su uso. Como control se usaron las mismas células electroporadas pero en medio solo sin microvesículas.

Luego de 24 horas se co-cultivaron las células K562 electroporadas con parásitos estresados 48 horas en RPMI en una relación parásito/célula de 1:20 a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub> en los diferentes tiempos estudiados. La observación de una infección productiva se observó por Microscopia Electrónica de Transmisión y por microscopia de epifluorescencia.

## ***Medios y soluciones en general.***

<b><u>PBS</u></b>	<b><u>10X</u></b>
ClK	27 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14.6 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40mM
ClNa	1,37 M

<b><u>TBE 5X</u></b>	<b><u>1L</u></b>
Tris-base	54gr.
Ác. Bórico	27,5 gr.
EDTA 0,5M pH:8,0	20 mL

### **Buffer de corrida geles de proteínas (5X)**

Tris 125 mM

Glicina 1.25M

SDS 0.5%

### **Coomassie blue G-250 staining solution**

200 ml acetic acid -1800 ml H<sub>2</sub>O

0.5 g Coomassie blue G-250

### **Solución de destaining**

Metanol : H<sub>2</sub>O : Ac Acet. Glacial

5% : 88% : 7%

### **Buffer de Transferencia (10X)**

Tris 250 mM

Glicina 1.92M

### **Ponceau S solution**

Dissolve 0.5 g Ponceau S in 1 ml glacial acetic acid. Bring to 100 ml with water.

Prepare just before use.

### **Pre-Hibridización (Solución de hibridación):**

2% BSA

5X Denhardt

4XSSC

5% dextran sulphate

35% formamide

0.5ug/uL tRNA esperma de salmón

10U/mL RNasin

### **SSC 20X. (1Litro).**

NaCl 175g 3M.

Citrato trisódico 2 hidrato 88g 0.3M.

### **Poly Lysina (sigma) hydrochloridre :**

10mg/mL sol STOCK (10X) en agua.

Sol de trabajo: 1X aprox 15 uL por laminilla.

### **LIT (1 litro)** (triptosa de infusión de hígado)

Disolver 5 gr de infusión de hígado, 5 gr de triptosa, 68 ml de 1M NaCl, 5.3 ml 1M KCl, 22 ml de 1M HPO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, 10 ml 20% glucosa, FILTRAR y agregar 1 ml hemina (1gr en 50 ml 0.2M NaOH), 10% SFB (10% final), 100 µg/ml estreptomicina y 100 U/ml penicilina.

**DAPI:** 1mg/mL solución STOCK 1000X en SSC1X

Sol de trabajo: 1X aprox 20uL por laminilla.

### 3. RESULTADOS

3.1 Clonado de sARNs en metacíclicos de *T. cruzi* Dm28c.

3.2 Sobre-expresión de TcPIWI-tryp no modifica fenotípicamente el perfil de sARNs ni produce cambios fenotípicos en parásitos.

3.3 TcPIWI-tryp une preferentemente fragmentos de ARNr y mitades de ARNt

3.4 Las mitades de ARNt y TcPIWI-tryp están asociados a Clatrina y son reclutados en reservosomas y vesículas intracelulares.

3.5 TcPIWI-tryp y las mitades de ARNt son intercambiadas entre parásitos mediante microvesículas.

3.6 Epimastigotes sometidos a stress nutricional liberan gran nivel de microvesículas al medio.

3.7 El perfil de los sARNs cargados en microvesículas secretadas por *Trypanosoma cruzi* revela la existencia de una firma molecular específica para la fracción extracelular.

3.8 El contenido proteico y de sARNs de las microvesículas es diferente entre cepas de *T. cruzi*: Brener, Dm28c e Y.

3.9 Las microvesículas secretadas por *T. cruzi* promueven la metaciclogenesis.

3.10 Los sARNs contenidos en microvesículas secretadas por *T. cruzi* son transferidos a sus células huésped susceptibles.

3.11 La Incorporación del contenido de MVs secretadas por *T. cruzi* en células HeLa modifica su expresión génica.

3.12 La incorporación del contenido de las microvesículas en células no-susceptibles confiere susceptibilidad a la infección.

#### 3.1 Clonado de sARNs en metacíclicos de *T. cruzi* Dm28c.

Dado que en epimastigotes de *T. cruzi* la segunda población mayoritaria de sARNs son las mitades de ARNt, nos propusimos realizar el mismo clonado en las formas metacíclicas para ver si en el estadio infectivo este perfil se mantenía. Este trabajo se realizó en colaboración con el Instituto Carlos Chagas de Curitiba Brasil, con el cual contamos con una historia de varias colaboraciones. El principal motivo de la presente colaboración fue por la facilidad de acceso a la cantidad de material de metacíclicos que se necesitaba y con la que ellos cuentan.

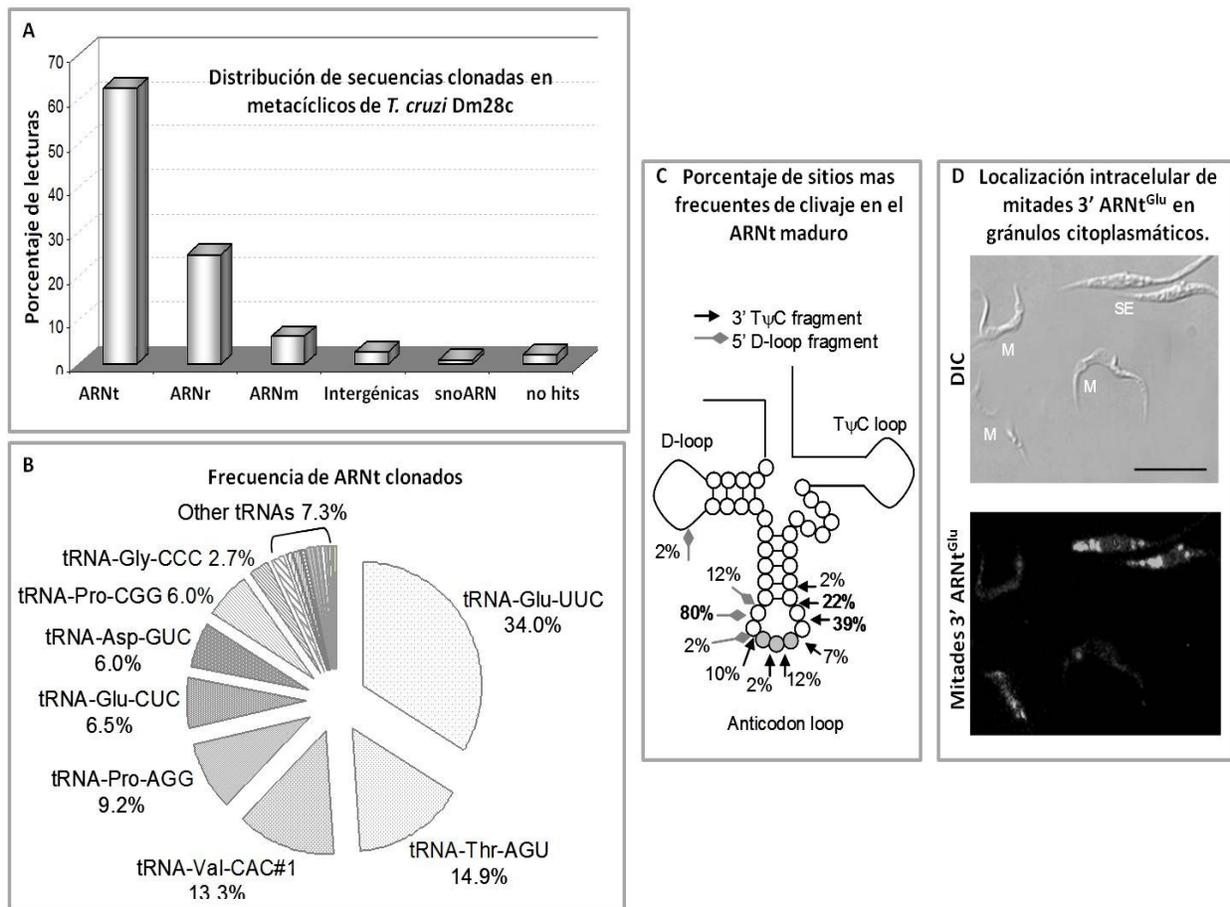
Con el objetivo de caracterizar la población de sARNs de formas metacíclicas llevamos a cabo un clonado de sARNs similar al realizado previamente para epimastigotes (Garcia-Silva et al. 2010). A primera vista, cuando se corrió el gel de ARN total para su fraccionamiento, el contenido que representa los sARNs se veía más intensamente en las formas metacíclicas que en epimastigotes, cuando se los compara en un gel teñido con Bromuro de Etidio.

Mediante el análisis de secuencias obtuvimos que, por un lado, mientras que en los epimastigotes las mitades de ARNt corresponden a un 26% de la población, en metacíclicos resultaron representar más de un 60% de los sARNs celulares (**Figura 15 A**). Por otro lado, similar a las mitades de ARNt en epimastigotes, en metacíclicos, los largos de los fragmentos hallados fueron de 30 a 35 nts, pero en contraste a epimastigotes donde la mayoría correspondían a mitades 5' del ARNt maduro, en metacíclicos la mayoría corresponden a mitades 3' del ARNt maduro.

En este nuevo clonado los ARNt más representados fueron ARNt<sup>Glu</sup>, ARNt<sup>Thr</sup>, ARNt<sup>Val</sup> y ARNt<sup>Pro</sup> (**Figura 15 B**). Cuando se estudia el tipo de corte que representan las secuencias clonadas con más frecuencia se observa que cerca del 80% de los clones correspondientes a ARNt terminan en dos posiciones posteriores al anticodon, generando fragmentos de ARNt un poco más largos que los encontrados para epimastigotes (**Figura 15 C**).

A continuación se estudio su localización intra-celular por medio de FISH y se observo que similar a lo que acontecía en epimastigotes, las mitades de ARNt para Glu se distribuían citoplasmáticamente en gránulos, pero más dispersos a lo largo de todo el cuerpo del parásito y de menor tamaño (**Figura 15 D**).

El enriquecimiento en mitades de ARNt en las formas tripomastigotes metacíclicos y su mayor dispersión en gránulos menores en todo el citoplasma, podría estar asociado con funciones específicas de estas moléculas, por ejemplo en la regulación de la expresión génica durante la metaciclogenesis.



**Figura 15: Clonado de sARNs en metacíclicos de *T. cruzi* Dm28c.** A. Se observa una grafica con la distribución de las secuencias clonadas en las diferentes poblaciones de sARNs expresada

en porcentaje. **B.** Se muestra la frecuencia para cada tipo de ARNt clonado. **C.** Esquema de clivado encontrado para los diferentes clones de ARNt, indicando con flechas el nucleótido donde se realiza el corte y el porcentaje correspondiente al número de secuencias clonadas para ese corte. **D.** FISH para revelar la localización sub-celular de la mitad 3' del ARNt GLU, ARNt clonado con más frecuencia.

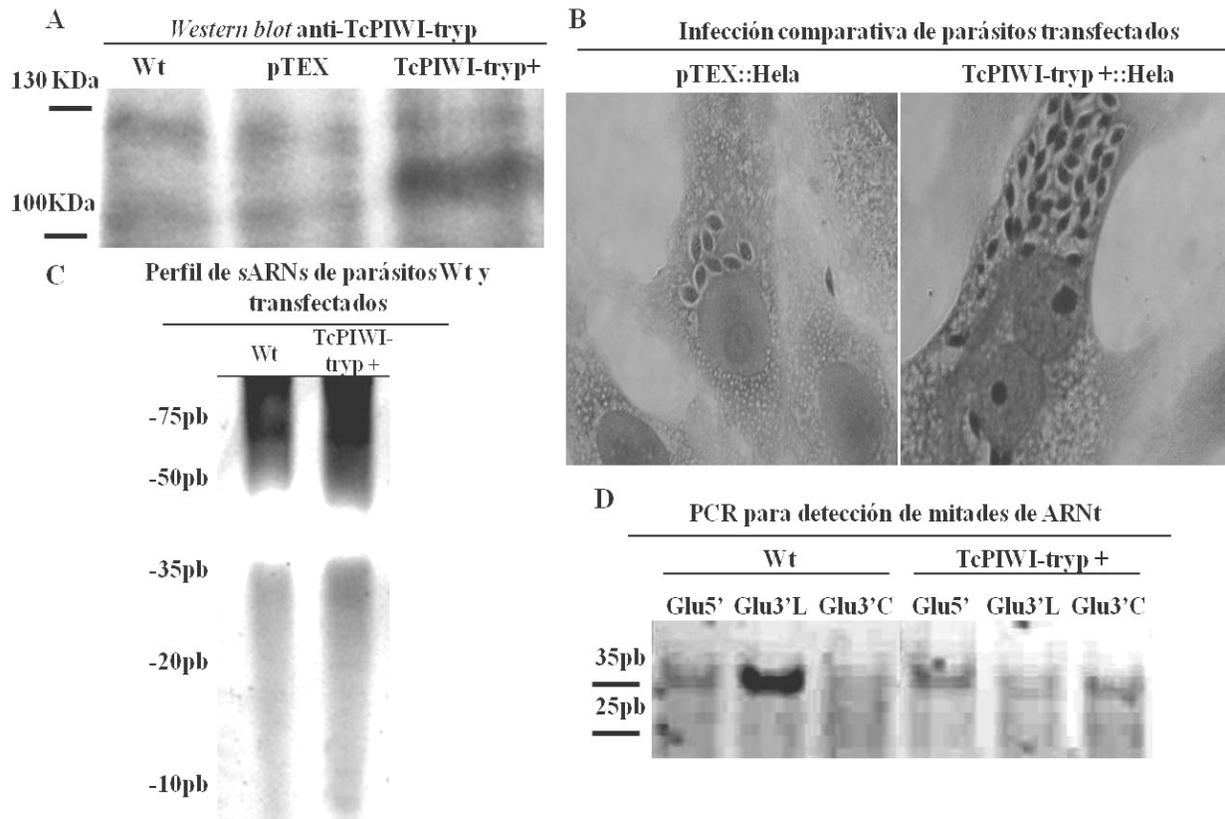
### 3.2 Sobre-expresión de TcPIWI-tryp no modifica fenotípicamente el perfil de sARNs ni produce cambios fenotípicos en parásitos.

Para poder estudiar la importancia o rol biológico del único miembro de la familia Argonauta presente en *T. cruzi*, decidimos construir parásitos deficientes y sobre-expresantes en esta proteína. Después de varios intentos fallidos de generar un parásito deficiente en TcPIWI-tryp, mediante el uso de vectores gentilmente cedidos por el Dr. Maurilho Soares del ICC, a los cuales les introducimos las regiones *upstream* y *downstream* del gen de TcPIWI-Tryp, decidimos seguir con los parásitos sobre-expresantes. Mediante la transfección de la región codificante para TcPIWI-tryp en el vector de expresión pTEX, logramos conseguir parásitos que expresaran cuatro veces por encima del nivel basal TcPIWI-tryp de parásitos salvajes (Wt) o de parásitos transfectados con el vector vacío (**Figura 16 A**).

Una vez obtenidos los parásitos sobre-expresantes de TcPIWI-tryp decidimos seguir posibles cambios fenotípicos de estos parásitos que pudieran deberse a la sobre-expresión de nuestra proteína. Buscamos alteraciones en la morfología, movilidad, proliferación, diferenciación y capacidad de infección de los parásitos transfectantes. No se observaron cambios fenotípicos significativos en ninguno de los caracteres estudiados. El único cambio que cabe destacar es que se observó un leve aumento del número de amastigotes por célula huésped (**Figura 16 B**) cuando la infección se realizó con los parásitos sobre-expresantes de TcPIWI-tryp, pero habría que repetir estos ensayos con un mayor número de células para ver si las diferencias son significativas.

A nivel molecular se procuró observar alguna diferencia en cuanto al perfil, o concentración de sARNs producidos por los parásitos Wt y los sobre-expresantes de TcPIWI-tryp. Por un lado cuando se observa el perfil general de los sARNs de los sobre-expresantes comparados con los Wt se aprecia un leve aumento de los mismos en un gel de acrilamida de ARN teñido con SYBR-Gold (**Figura 16 C**). Por el otro lado cuando intentamos detectar específicamente mediante PCR algunas mitades de ARNt (cebadores explicados y mostrados en materiales y métodos), se observa que no hay gran diferencia entre los grupos de parásitos, excepto para la mitad 3' del ARNt de GLU, el cual parece haber disminuido su concentración en los parásitos sobre-expresantes para TcPIWI-tryp (**Figura 16 D**).

Estos datos sugieren que la sobre-expresión de TcPIWI-tryp no genera cambios significativos fenotípicos ni a nivel celular ni molecular. Los cambios observados fueron muy leves, y se necesitan más ensayos para validar su relevancia. En el futuro se deberán dedicar mayores esfuerzos en la construcción de parásitos deficientes en TcPIWI-tryp, de forma de poder dilucidar su importancia biológica en estos parásitos.



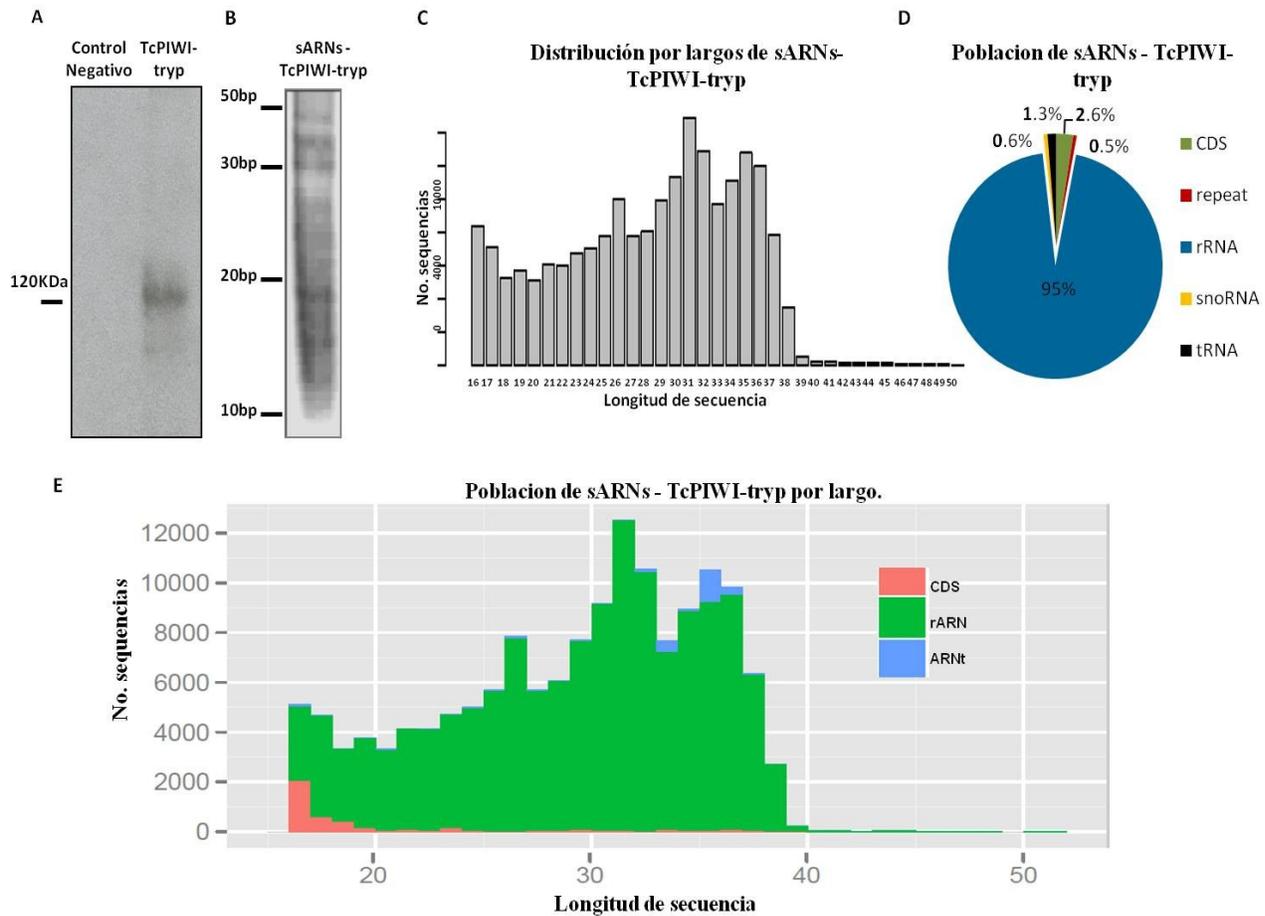
**Figura 16: Ensayos con los parásitos sobre-expresantes de TcPIWI-tryp obtenidos.** **A.** Western blot para verificar la sobre-expresión de TcPIWI-tryp, se observan extractos totales de parásitos: salvajes, no transfectados (wt), transfectados con el vector pTEX (pTEX) y con el vector pTEX mas el gen de TcPIWI-tryp (PIWI+). **B.** Infección comparativa de células HeLa con parásitos transfectantes con el vector pTEX vacío y sobre-expresantes de tcPIWI-tryp, se muestra una célula representativa donde se observan amastigotes intracelulares. **C.** Gel de poliacrilamida 15% Urea 7M teñido con SyBr Gold donde se muestran sARN de extractos de parásitos wt y sobre-expresantes. **D.** PCR para la detección de fragmentos derivados de ARNt en parásitos Wt y sobre-expresantes (PIWI+).

### 3.3 TcPIWI-tryp une preferentemente fragmentos de ARNr y mitades de ARNt

Como mencionamos anteriormente en la introducción, la maquinaria de ARNi parece haberse perdido o simplificado en algunos organismos eucariotas unicelulares como *S. cerevisiae*, *T. cruzi*, *L. major*, y *P. falciparum*, los cuales son incapaces de usar ARNdc para silenciar genes (Lye et al. 2010; Atayde et al. 2011). Sin embargo, *T. cruzi* expresa una proteína de la familia Argonauta, TcPIWI-tryp, que recuerda las Argonautas canónicas en termino de conservación de secuencia y de arquitectura de sus dominios, la cual venimos estudiando en el laboratorio (Garcia Silva et al. 2010). En el presente proyecto, nos propusimos analizar la población de sARNs que carga esta proteína característica de trypanosomátidos.

Mediante el protocolo de inmunoprecipitación descrito en materiales y métodos, se pudo obtener una fracción de complejos ribonucleoprotéicos que fueron reactivos específicamente para el suero anti-TcPIWI-tryp, observándose mediante *Western blot* solo una banda correspondiente a TcPIWI-tryp en la fracción inmunoprecipitada (**Figura 17 A**). Obtuvimos 300 ng de sARNs que co-inmunoprecipitaron con TcPIWI-tryp cuando partimos de un extracto celular total de 30 ug. Los mismos presentaban un perfil de bandas desde 50pb hasta 15 pb (**Figura 17 B**). Posteriormente, con estos sARNs se generaron librerías para su secuenciado en sistema Illumina en el equipo Genome Analyzer II. Como resultado del secuenciado masivo se obtuvieron 199,570 que alinearon con el genoma de *T. cruzi* de una longitud de entre 16nt y 50 nt, con una media de 29nt, y que presentan dos picos predominantes a 27 y 31 nts (**Figura 17 C**). Cuando se analiza a que precursores de ARN corresponden nuestros sARNs co-inmunoprecipitados con TcPIWI-tryp, se observa que la población estudiada está representada principalmente por 5 clases de sRNAs, donde la mayoría derivan de ARNr (sARNr: aproximadamente 95% de las secuencias), mARNs, ARNt, sn/snoARNs y repetidos genómicos (**Figura 17 D**).

El análisis de la distribución de las secuencias por largos, reveló que los sARNs derivados de ARNm (~2% de las secuencias) parecerían ser productos resultados de degradación, por su pequeño tamaño y el bajo número de secuencias únicas que se encontraron. Con respecto a las secuencias de entre 34 y 37 nt de largo, los sARNs derivados de ARNt alcanzaron cerca del 5% de los sARNs (**Figura 17 E**). En resumen, TcPIWI-tryp parece unir preferentemente sARNr y fragmentos derivados de ARNt, lo que resulta diferente de las proteínas de la familia Argonauta previamente descritas y que mencionaremos en la discusión.



**Figura 17: Ensayo de inmunoprecipitación de TcPIWI-tryp y sARNs unidos a ella.**

(A) *Western blot* de los extractos obtenidos con suero específico para la detección de TcPIWI-tryp, se muestran los resultados para el extracto control realizado con Inmunoglobulinas de conejo y para la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo específico. La muestra TcPIWI-tryp muestra una clara banda inmunoreactiva del tamaño esperado ~120kDa. (B) Gel desnaturalizante de poliacrilamida q5% Urea 7.5M donde se tiñeron con SYBR-Gold la fracción de sARNs co-inmunoprecipitada con TcPIWI-tryp. (C) Distribución por largos de las secuencias de sARNs obtenidas unidas a TcPIWI-tryp. Se muestran dos picos predominantes a ~27 y ~31nts. (D) Clasificación de las secuencias obtenidas de acuerdo a su precursor. El número de secuencias se indica en paréntesis, el % de sARNs refiere a secuencias únicas. (E) Distribución por longitud de secuencia de los sARNs obtenidos diferenciando por precursor de ARN. Los fragmentos derivados de ARNt muestran picos en los sARNs más largos (~30-38nts).

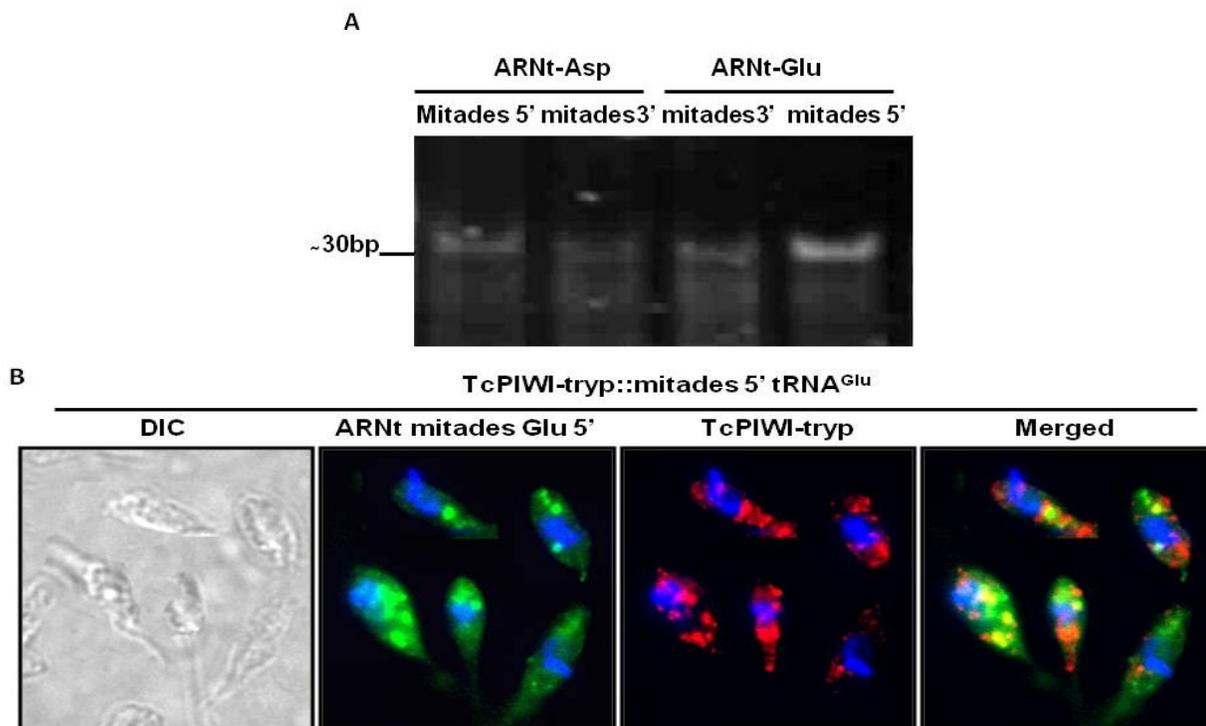
A continuación, realizamos un análisis con mayor profundidad de las secuencias correspondientes a las principales poblaciones de sARNs encontradas. El estudio de las secuencias derivadas de ARNr fue complicado, principalmente porque los genes para ARNr en el proyecto genoma de *T. cruzi* se encuentran dispersos en diferentes *contigs*, haciendo difícil llevar a cabo los alineamientos. Con respecto a lo que pudimos analizar, analizamos la frecuencia nucleotídica a lo largo de los extremos 5' y 3' de las secuencias encontradas, para ver la posible preferencia de clivado de estos sARNs. Los resultados mostraron que la frecuencia de A, T, G y C es relativamente homogénea entre los sARNs encontrados. Sin embargo, la frecuencia para el nucleótido Timidina se vio levemente incrementada hacia el extremo 3' de los sARNr secuenciados (**Figura 18 A**). Por otro lado, se compararon los largos de las secuencias derivadas de las subunidades ribosomales mayor y menor, observándose un desvío pequeño pero con significado estadístico de las secuencias obtenidas hacia sARNs más largos que derivan de la subunidad ribosomal menor (**Figura 18 B**).

El análisis de las secuencias correspondientes a fragmentos derivados de ARNt, reveló que la mayoría de los mismos corresponden al extremo 5' de los ARNt maduros. Este perfil solo cambia para los fragmentos derivados de ARNt<sup>Tyr</sup>, ARNt<sup>Phe</sup> y ARNt<sup>His</sup>, para los cuales todas las secuencias obtenidas corresponden a extremos 3' del ARNt maduro. Aproximadamente el 87% de las secuencias para ARNt corresponden a fragmentos derivados del ARNt<sup>Glu</sup> 5', estando representados en menor porcentaje: ARNt<sup>Val</sup>, ARNt<sup>His</sup>, ARNt<sup>Tyr</sup>, ARNt<sup>Asp</sup>, ARNt<sup>Gln</sup>, ARNt<sup>Ile</sup>, ARNt<sup>Leu</sup>, ARNt<sup>Phe</sup>, ARNt<sup>Ala</sup> y ARNt<sup>Gly</sup> (**Figura 18 C**). En la **Figura 18 D** se muestra un análisis realizado para el ARNt más frecuente, ARNt<sup>Glu</sup>. Es de notar, que en el genoma de *T. cruzi* CL Brener hay por lo menos cuatro genes para el ARNt<sup>Glu</sup>, y que nuestro análisis reveló algún polimorfismo dentro de estos genes, por ejemplo en la posición 5, 4 sARNs tienen una A en lugar de una G como se describe en el genoma en esta posición. También se puede apreciar la preferencia de clivado para las mitades 5', mostrado con una flecha, en la región del anticodon.



Con el objetivo de validar estos resultados provenientes del secuenciado masivo, realizamos PCR del producto resultante de la inmunoprecipitación anti-TcPIWI-tryp, para detectar específicamente alguno de los sARNs derivados de ARNt secuenciados. Mediante el diseño de este tipo de PCRs para sARNs fuimos capaces de detectar ambas mitades 5' y 3' correspondiente a los ARNt Asp y Glu, los productos obtenidos fueron verificados mediante su clonado y secuenciado (**Figura 19 A**). Como puede observarse, con este método fuimos capaces de detectar las mitades 3' para el ARNt Glu, las cuales no se encontraron en el secuenciado, esto puede deberse a que el secuenciado no llego a saturación, debido al bajo número de lecturas obtenido, y que el método de PCR es lo suficientemente sensible como para detectarlas.

Por otro lado, realizamos ensayos de inmunolocalización de TcPIWI-tryp acoplados a FISH para las mitades de ARNt de manera de poder ver si efectivamente en el parásito se encuentran co-localizando. Como se observa en la **Figura 19 B** en parásitos sometidos a estrés nutricional, donde los gránulos de mitades de ARNt son más evidentes, se puede apreciar una co-localización parcial de ambas moléculas estudiadas.



**Figura 19: Validación de las mitades de ARNt encontradas unidas a TcPIWI-tryp. (A)** Imagen del gel de agarosa donde se muestra el resultado de las PCRs específicas para algunas mitades de ARNt realizadas sobre la fracción de ARN co-inmunoprecipitada con TcPIWI-tryp. Dicha PCR confirma la presencia de mitades de ARNt derivadas de ARNt<sup>Asp</sup> y ARNt<sup>Glu</sup> unidas a TcPIWI-tryp. **(B)**. Ensayos de inmunolocalización de TcPIWI-tryp acoplados a FISH para mitades de ARNt de Glu, revelan una co-localización parcial subcellular en gránulos

citoplasmáticos de estas moléculas en epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c sometidos a estrés nutricional.

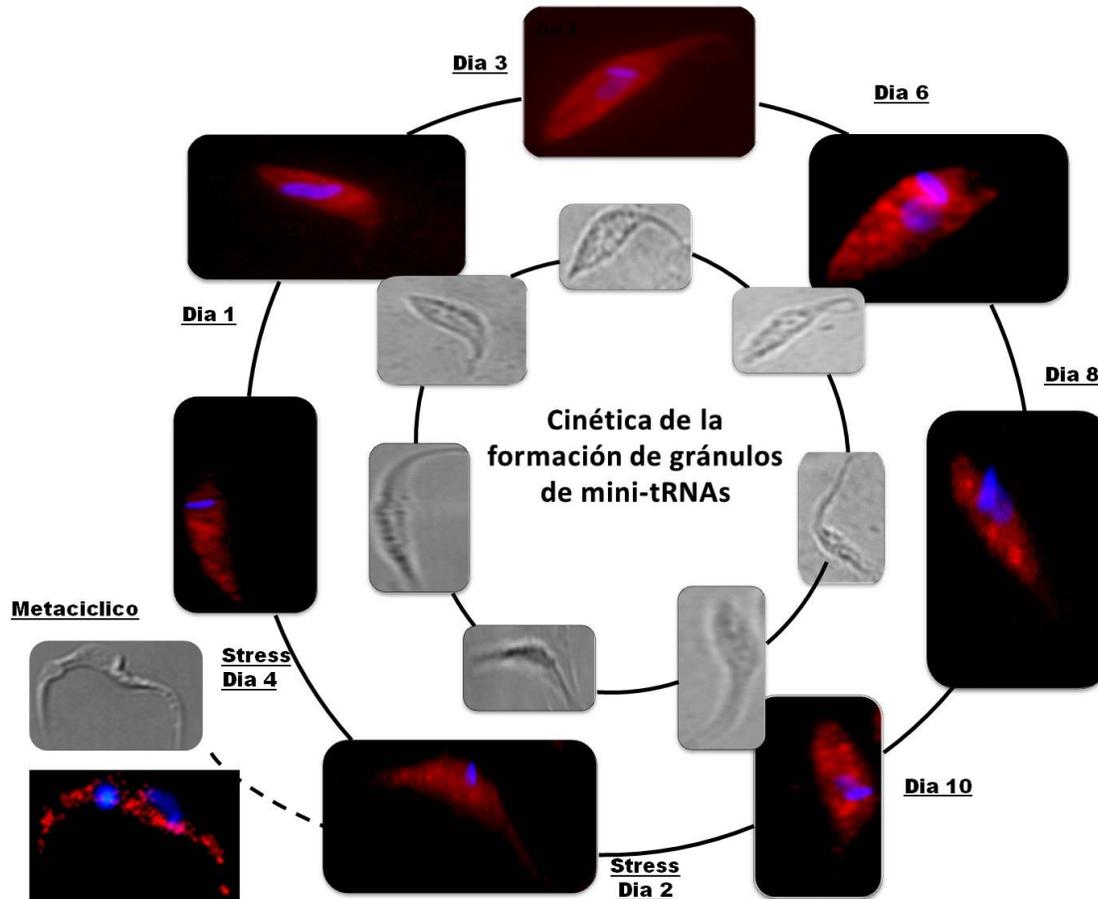
En este punto del análisis me gustaría destacar un estudio reciente donde se describe que algunos sARNs canónicos bien conocidos como piARNs y miARNs pueden ser mapeados en genes de ARNr (Wei et al. 2013). Nosotros realizamos una búsqueda similar para los sARNs más abundantes co-inmunoprecipitados con TcPIWI-tryp y resultó que alguno de ellos mapeaban muy bien con algunos miARNs presentes en miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Para el análisis se tomaron siempre porcentajes de similitud mayores al 73%. Como resultado final obtuvimos que tres de los sARNs más representados en nuestras secuencias son muy semejantes al bucle de algunos miARNs maduros:

- sARNr de *T. cruzi*: CTCGGGTGGAGGCCTGTAGCGATGCTGACGT:: ola-mir-221 de *Oryzias latipes*.
- sARNr de *T. cruzi*: AACGTGTCGCGATGGATGACTTGGCTTCCTATTT:: cme-MIR169e de *Cucumis melo* y
- sARNr de *T. cruzi*: CGCCAAGCTAATACATGAACCAACCGGATGTTCTCT:: dsi-mir-963 de *Drosophila simulans*.

Cabe destacar que la región semilla de estos miARNs no mapea exactamente con estos sARNs de *T. cruzi*. Estos resultados podrían estar indicando una posible vía evolutiva para estos sARNs canónicos a partir de ARNs estructurales presentes en la célula.

### 3.4 Las mitades de ARNt y TcPIWI-tryp están asociadas a Clatrina y son reclutados en reservosomas y vesículas intracelulares.

En un trabajo previo, reportamos que los epimastigotes de *T. cruzi* cuando son sometidos a estrés nutricional producen una abundante población de mitades de ARNt, las cuales son reclutadas en estructuras granulares citoplasmáticas muy particulares (Garcia-Silva et al. 2010). En el presente trabajo como primera aproximación para caracterizar estas estructuras nos propusimos seguir la dinámica o cinética de formación de estas estructuras granulares mediante FISH para las mitades 5' del ARNt<sup>Asp</sup>. Como se observa en la **Figura 20** al comienzo del ciclo de vida, en el día 1 posterior a un pasaje completo de cultivo, completando con medio nuevo y SBF, la distribución de la sonda estudiada es citoplasmática difusa. Con el correr del tiempo en cultivo y a los 6 días del mismo, lo que se podría considerar un cultivo en fase estacionaria de crecimiento, donde los nutrientes comienzan a escasear, comienzan a aparecer las estructuras granulares citoplasmáticas de mitades de ARNt. Estos gránulos se mantienen hasta el día 10, luego de someter a los parásitos a estrés nutricional durante 4 días y cuando ya alguno ha virado a su forma metacíclica, los gránulos comienzan a disminuir de tamaño pero siguen presentes.



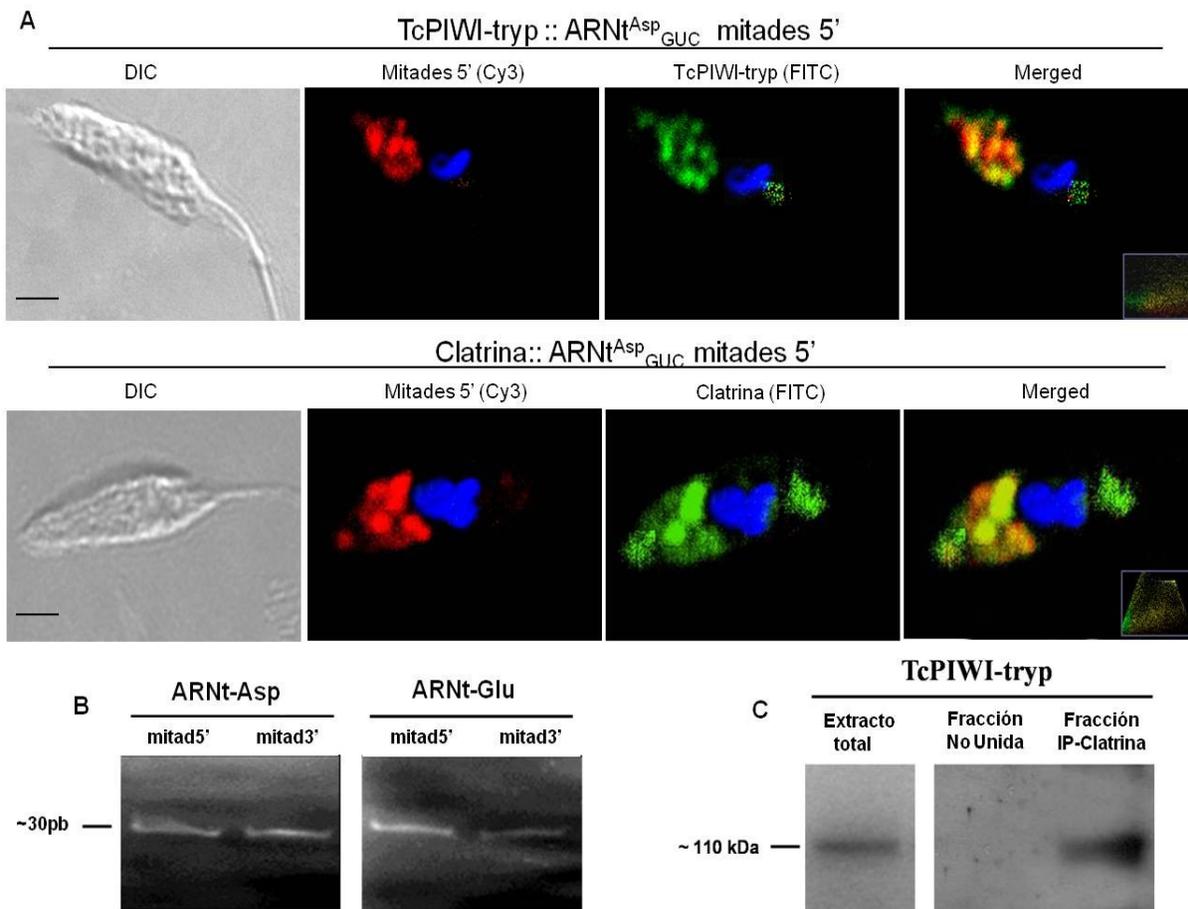
**Figura 20: Cinética de la formación de gránulos de mitades de ARNt en *T. cruzi*.** Se observan imágenes de FISH con sonda para mitades 5' del ARNt Asp en rojo y ADN en azul a diferentes días de cultivo, parásitos sometidos a estrés nutricional y metacíclicos.

Esta dinámica recuerda a lo que sucede con los reservosomas. Los reservosomas son organelos de almacenamiento de una gran cantidad de nutrientes del medio extracelular y del contenido intracelular que son cargados a través de vesículas endocíticas originadas en el citóstoma del parásito y en el bolsillo flagelar (Cunha-e-Silva et al. 2006). Como en otros eucariotas, los tripanosomátidos presentan una maquinaria de endocitosis mediada por Clatrina, donde la recubierta de Clatrina fue encontrada en ambos tipos de vesículas, en vesículas de endocitosis temprana y en las membranas de la red del *trans*-Golgi (Allen et al. 2003; Correa et al. 2007).

Con el objetivo de obtener más conocimiento sobre la distribución intra-celular de las mitades de ARNt y de su eventual asociación con vesículas recubiertas por Clatrina, realizamos ensayos de co-localización con anticuerpos específicos anti-Clatrina y TcPIWI-tryp, acoplado el ensayo a FISH con el uso de sondas para detectar las mitades de ARNt. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 21 A**, se muestra una co-localización evidente de las mitades de ARNt estudiadas con TcPIWI-tryp y con estructuras granulares intracelulares asociadas a

Clatrina. Además de la señal granular se pudo observar una leve señal tanto para TcPWI-tryp como para las mitades del ARNt<sup>Asp</sup> localizada en la región anterior del cuerpo del parásito donde se localiza el bolsillo flagelar y el citóstoma.

Por otro lado, para verificar lo observado por microscopia confocal, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de Clatrina de la fracción citosólica usando un anticuerpo específico para Clatrina cedido gentilmente por el Dr. Maurilio Soares. En la **Figura 21 B y 21 C** se muestran los resultados obtenidos para los ensayos realizados sobre la fracción co-inmunoprecipitada con Clatrina. Se puede observar que en la fracción correspondiente a ARN se pudieron detectar mediante RT-PCR específica las mitades 5' y 3' de los ARNt<sup>Glu</sup> y ARNt<sup>Asp</sup> (**Figura 21 B**). A su vez, en la fracción co-inmunoprecipitada correspondiente a proteínas, se pudo detectar la presencia de TcPIWI-tryp demostrado por *Western blot* específico para esta proteína (**Figura 21 C**).

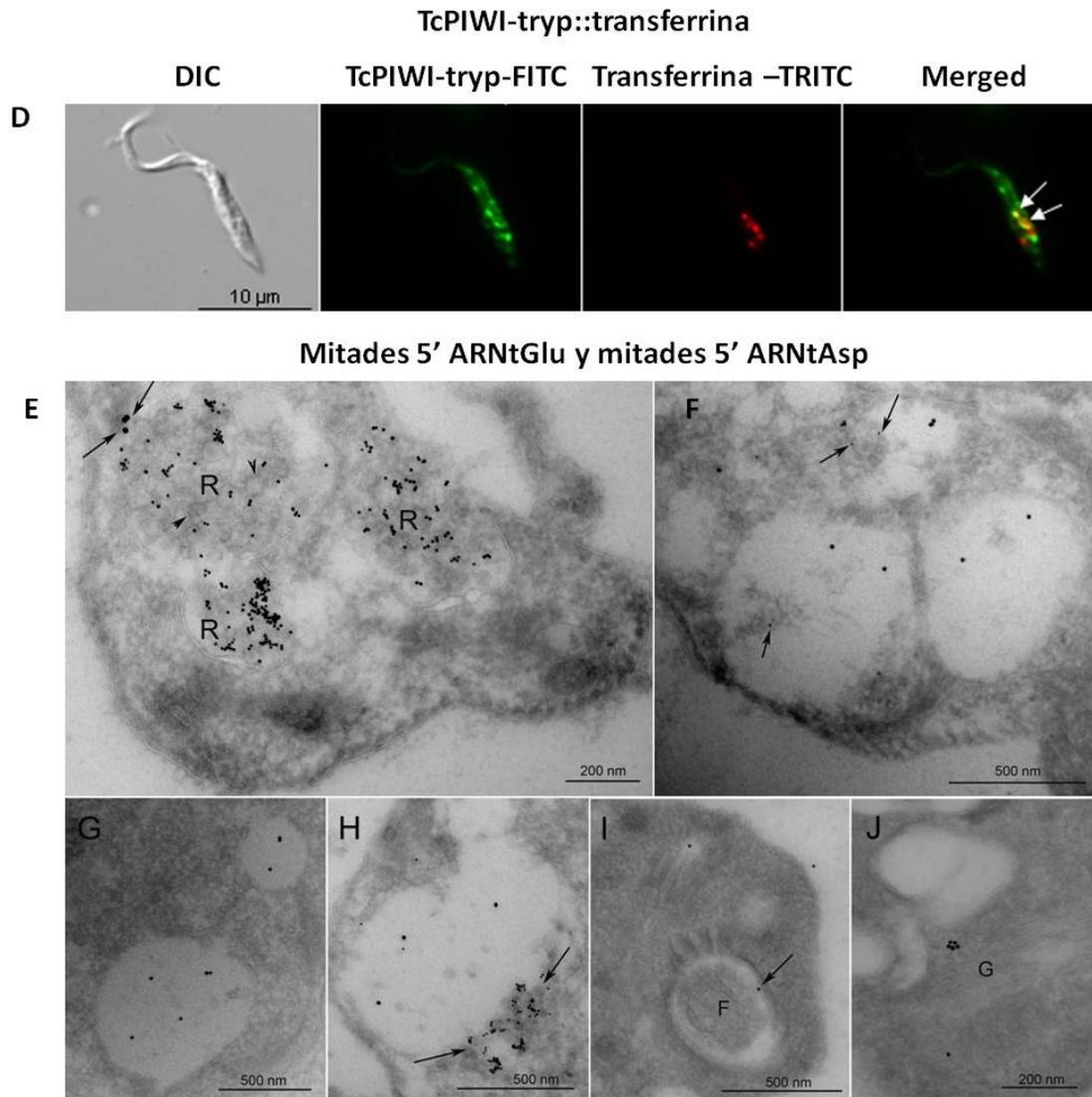


**Figura 21: Co-localización de mitades de ARNt y TcPIWI-Tryp con Clatrina.** (A) Se observan inmunofluorescencias acopladas a FISH para mitades 5' del ARNt<sup>Asp</sup> (rojo), en el panel superior se observa co-localización con TcPiwi-tryp (verde) y en panel inferior con Clatrina. (Barra de escala = 5  $\mu$ m). Las graficas en la esquina inferior derecha de las imágenes

superpuestas muestran el grado de solapamiento de las señales verde y roja (colocalización se muestra en amarillo). **(B)** Resultados de los ensayos de RT-PCR en la fracción de ARN inmunoprecipitada con Clatrina para las mitades 5' y 3' de los ARNt<sup>Asp</sup> y ARNt<sup>Glu</sup> **(C)** *Western blot* donde se muestra la detección de TcPIWI-tryp en la fracción proteica inmunoprecipitada con Clatrina comparada con la fracción no unida como control negativo y extracto total como control positivo.

Como primera aproximación para demostrar una posible participación de TcPIWI-tryp en vías de endocitosis mediadas por Clatrina, decidimos hacer ensayos de endocitosis con Transferrina marcada (la cual se sabe que su ingreso a la célula es mediado por el receptor de transferrina por medio de su incorporación en vesículas recubiertas por Clatrina). Una vez realizada la incorporación de la transferrina marcada *in vivo*, realizamos ensayos de inmunolocalización de TcPIWI-tryp, en microscopia confocal y evidenciamos una colocalización parcial de ambas moléculas en estructuras que recuerdan a los reservosomas (**Figura 22 D**).

Mediante el uso de microscopia electrónica de transmisión y por medio de hibridación *in situ* con sondas marcadas con Biotina para la detección de las mitades de ARNt (estreptavidina-oro) profundizamos en la localización sub-celular de estas moléculas. Los resultados obtenidos claramente demuestran que las mitades de ARNt se localizan en vesículas intracelulares que incluyen principalmente reservosomas y otras vesículas dispersas en el citoplasma, regiones del complejo del Golgi y el bolsillo flagelar (**Figura 22 E-J**). Estos resultados junto con el anterior estudio de co-localización con transferrina estarían indicando una posible participación de las mitades de ARNt en las vías endo/exocíticas de *T. cruzi*.



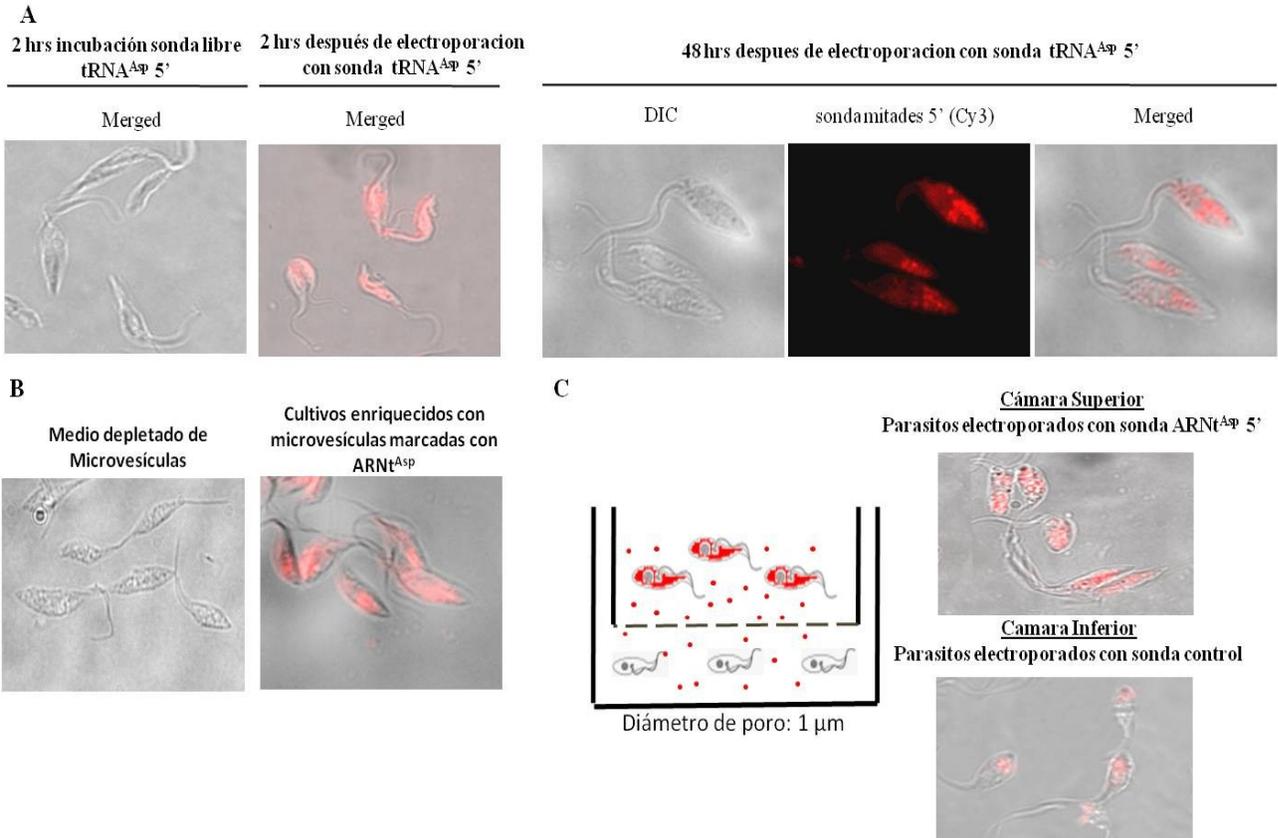
**Figura 22: Localización subcelular por hibridación *in situ* con estravidina-oro de las mitades de ARNt<sup>Asp</sup> en epimastigotes de *T. cruzi* sometidos a estrés. (D)** Epimastigotes precargados con Transferrina-Alexa Fluor 594, marcando reservosomas, e incubados posteriormente con anticuerpos TcPIWI-tryp (rojo). En la imagen superpuesta se indican con flechas algunas vesículas con doble marcación. **(E-H)** Micrografías representativas de la localización de las mitades de ARNt<sup>Asp</sup> (flechas) en reservosomas (R) y en diferentes estructuras vesiculares citoplasmáticas; **(I)** Imagen representativa de vesículas marcadas en el bolsillo flagelar (F). **(J)** Imagen representativa de la sonda en las cisternas del Aparato de Golgi (G).

### 3.5 TcPIWI-tryp y las mitades de ARNt son intercambiadas entre parásitos mediante microvesículas con mínimas consecuencias fenotípicas.

Como discutimos previamente, el reclutamiento de los fragmentos de ARN derivados de ARNt y la proteína TcPIWI-tryp en vesículas intracelulares, nos puede estar sugiriendo que estas moléculas formarían parte de las vías endo/exocíticas celulares en *T. cruzi* (Allen et al. 2003; Correa et al. 2007). Por otro lado, existen evidencias que las microvesículas secretadas por células de mamífero por ejemplo, llevan información génica y proteínas a sus células receptoras en una novedosa forma de comunicación celular (Camussi et al. 2010).

En el presente trabajo, nos propusimos estudiar el eventual rol de las microvesículas secretadas por *T. cruzi* como un medio de transferencia de material biológico (incluyendo sRNAs derivados de tRNAs) entre parásitos (homotípica) y hacia células huésped. Para poder realizar este seguimiento procedimos como se indica en materiales y métodos con ensayos en *transwells*. Para ello marcamos parásitos mediante electroporación con sondas fluorescentes (Cy3) de las mitades de ARNt Glu y Asp. Como control se utilizó sonda libre en el medio de forma de comprobar que los parásitos por sí mismos no incorporan la sonda del medio en alguna especie de “soaking”. La eficiencia de la electroporación y la distribución de la sonda fluorescente mostraron que después de transcurridas dos horas de la incorporación de la sonda, la misma presenta una distribución citoplasmática difusa en más del 95% de los parásitos. La distribución típica granular de las mitades de ARNt se comenzó a evidenciar luego de 24 horas de mantener a los parásitos en condiciones de estrés y así se mantuvo por lo menos hasta las 72 horas (**Figura 23 A**). Estos resultados demuestran que el marcado de los parásitos mediante electroporación con sondas fluorescentes de mitades de ARNt podría simular la localización y distribución intracelular de las sARNs endógenos del parásito.

A continuación, se colectaron las microvesículas secretadas por los parásitos marcados a las 48 horas, mediante ultracentrifugación. Como control, se incubaron parásitos no marcados con el sobrenadante de esta ultracentrifugación libre de microvesículas, y no se observó incorporación de alguna señal de fluorescencia detectable (**Figura 23 B**). A su vez, los parásitos que por otro lado se incubaron con las microvesículas incorporaron la señal fluorescente, la cual adopto la típica distribución granular observada para las mitades de ARNt en la región posterior de los parásitos. Estos ensayos se llevaron a cabo en cámaras de *transwell* que separaron los parásitos sin marcar de los marcados por un filtro con un diámetro de poro de 1,0  $\mu\text{m}$  como se muestra en la **Figura 23 C**. A las 2 horas de comenzado los ensayos de *transwells* ya se observó una incorporación de la señal fluorescente en los parásitos no marcados de la cámara inferior en un patrón granular. Es de destacar, que estos ensayos se repitieron con sondas control con diferentes secuencias, las cuales todas se comportaron de la misma manera, lo que indicaría que el fenómeno observado no sería secuencia específico. Nuestros datos claramente sugieren que por lo menos las mitades de ARNt son liberadas al medio extra-celular contenidas en microvesículas y son incorporadas por otros parásitos vecinos.



**Figura 23: Intercambio de mitades de ARNt entre parásitos a través de microvesículas. (A)** Seguimiento por microscopía de epifluorescencia de controles. Izquierda: par'asitos incubados en presencia de sonda fluorescente libre 2 horas y parásitos electroporados con sonda fluorescente y Derecha: mismos parásitos electroporados 48 horas después donde se aprecia la formación de gránulos fluorescentes. **(B)** parásitos incubados en medio depletado de microvesículas comparado con aquellos cultivados en medio enriquecido con microvesículas marcadas. **(C)** Ensayos con *transwells*, Izquierda: se muestra el esquema usado en los ensayos y Derecha: resultado observado al microscopio, donde la fluorescencia se observó transferirse de la cámara superior a la inferior a través del filtro.

Una vez puestos a puntos los ensayos de *transwell* y de intercambio de material génico principalmente del enriquecimiento en mitades de ARNt estudiadas, nos propusimos poder identificar posibles cambios fenotípicos en parásitos receptores de estas mitades de ARNt. Para ello observamos los parásitos de la cámara superior electroporados y de la inferior receptores de la sonda a través de las microvesículas. No se observaron cambios fenotípicos evidentes en los parásitos de dichas cámaras, con la excepción de que los parásitos de la cámara inferior a las 48 horas de ensayo comenzaban a afinarse pareciéndose más a un epimastigote alargado o a un metacíclico.

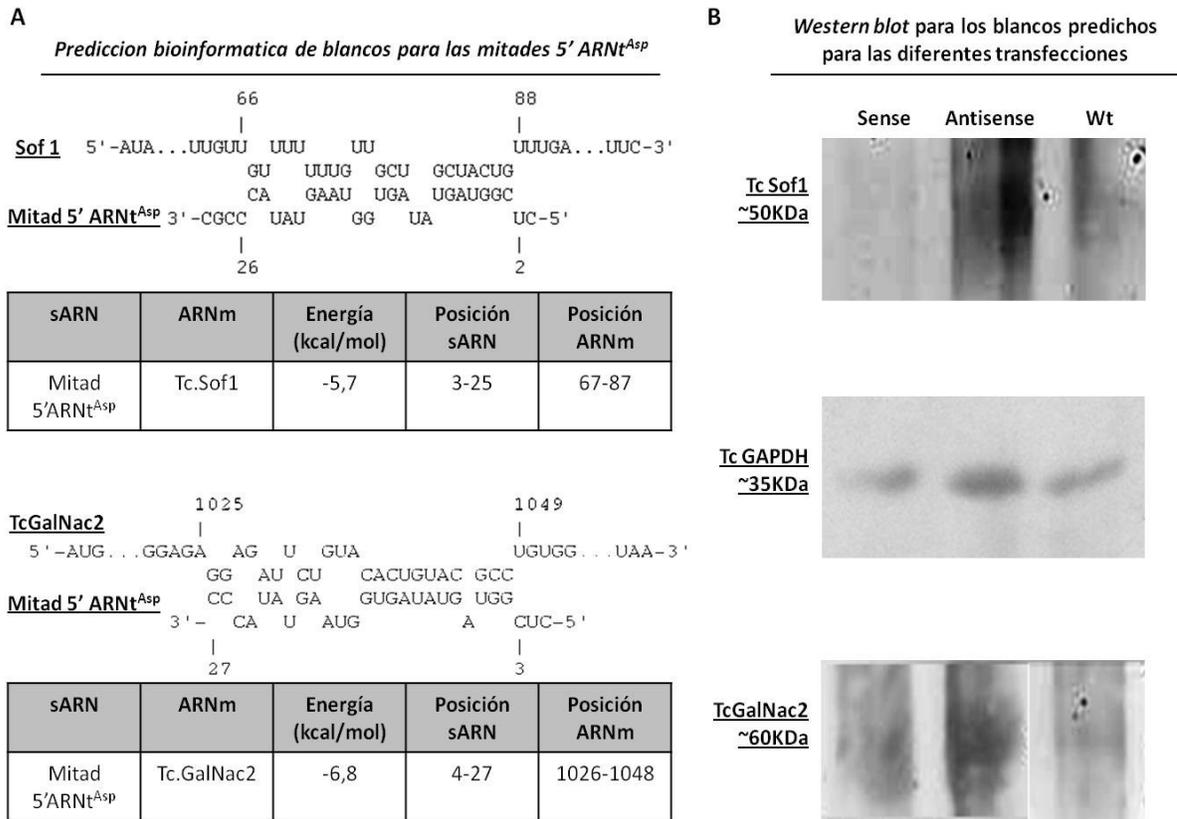
Dado que no se observaron cambios fenotípicos evidentes pero que los parásitos parecieran empezar a transformarse en metacíclicos, decidimos estudiar si existía algún cambio a nivel molecular, de expresión génica de alguna proteína de nuestro interés, por ejemplo que se exprese diferencialmente en metacíclicos. Para ello contábamos entre los candidatos de dos genes con los que trabajaban laboratorios con los cuales colaboramos, TcSof1 y TcGalNac2.

TcSof1, es una proteína de la subunidad menor del ARNr asociada al proteosoma, la cual se ha descrito se encuentra regulada a nivel traduccional durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, la misma se encuentra localizada a nivel nuclear y disminuye su expresión durante la metaciclogénesis, pero el mecanismo de control de su expresión no ha sido completamente dilucidado (Nardelli et al. 2007). El Dr. Bruno Dellagiovanna gentilmente nos cedió el suero anti-TcSof1 para hacer ensayos de su expresión en parásitos que sobre-expresen nuestras mitades de ARNt.

La glicosil transferasa TcOGNT-2 (TcGalNac2), es la enzima responsable de la adición del primer residuo GlcNAc de un UDP-GlcNAc a un residuo serina o treonina para la formación del cáliz de glicanos que cubre la superficie de *T. cruzi*; recientemente se ha encontrado que la misma se encuentra expresada diferencialmente a lo largo del ciclo de vida del parásito, y que su sobre-expresión aumenta la infectividad de *T. cruzi* (Chiribao et al. 2012). El Dr. Carlos Robello nos cedió el suero anti-TcGalNac2 para hacer ensayos de su expresión en parásitos que sobre-expresen nuestras mitades de ARNt, dado que el control de su expresión génica no ha sido completamente descrito.

Se realizó un análisis bioinformático para la predicción de blancos o sitios semilla de apareamiento de nuestras mitades de ARNt<sup>Asp</sup> y el ARNm con su correspondiente 3'UTR de cada uno de los genes estudiados. Este análisis reveló que tanto el 3'UTR de TcSof1 como el de TcGalNac2 presentan regiones semillas (mayores a 7 pb) para las mitades de ARNt<sup>Asp</sup> con una energía libre aceptable para estas estructuras (**Figura 24 A**).

Posteriormente se realizaron los ensayos *western blot* para la detección de TcSof1 y TcGalNac 2 en los extractos de parásitos *wild type*, sobre-expresantes para mitades de ARNt<sup>Asp</sup> y sobre-expresantes de la sonda antisentido para estas mitades (lo que busca producir una disminución de dichos sARNs) a los cuales los consideramos disminuidos en estas mitades de ARNt<sup>Asp</sup>. Como control de carga se usó GAPDH, un gen “*housekeeping*” que se expresa constitutivamente en el parásito y que no presenta regiones semillas para las sondas usadas. Como se observa en la **Figura 24 B**, la detección de las proteínas estudiadas fue difícil, dado tal vez a la condición de almacenamiento de los antisueros en el viaje de entrega, por ejemplo. La interpretación de estos resultados no fue muy fácil, pero pareciera que los dos genes estudiados aumentaron su expresión en los parásitos donde las mitades de ARNt<sup>Asp</sup> se encontraban inhibidas por la sonda antisentido. Estos ensayos siguen siendo puestos a punto y los resultados continúan en proceso de análisis.

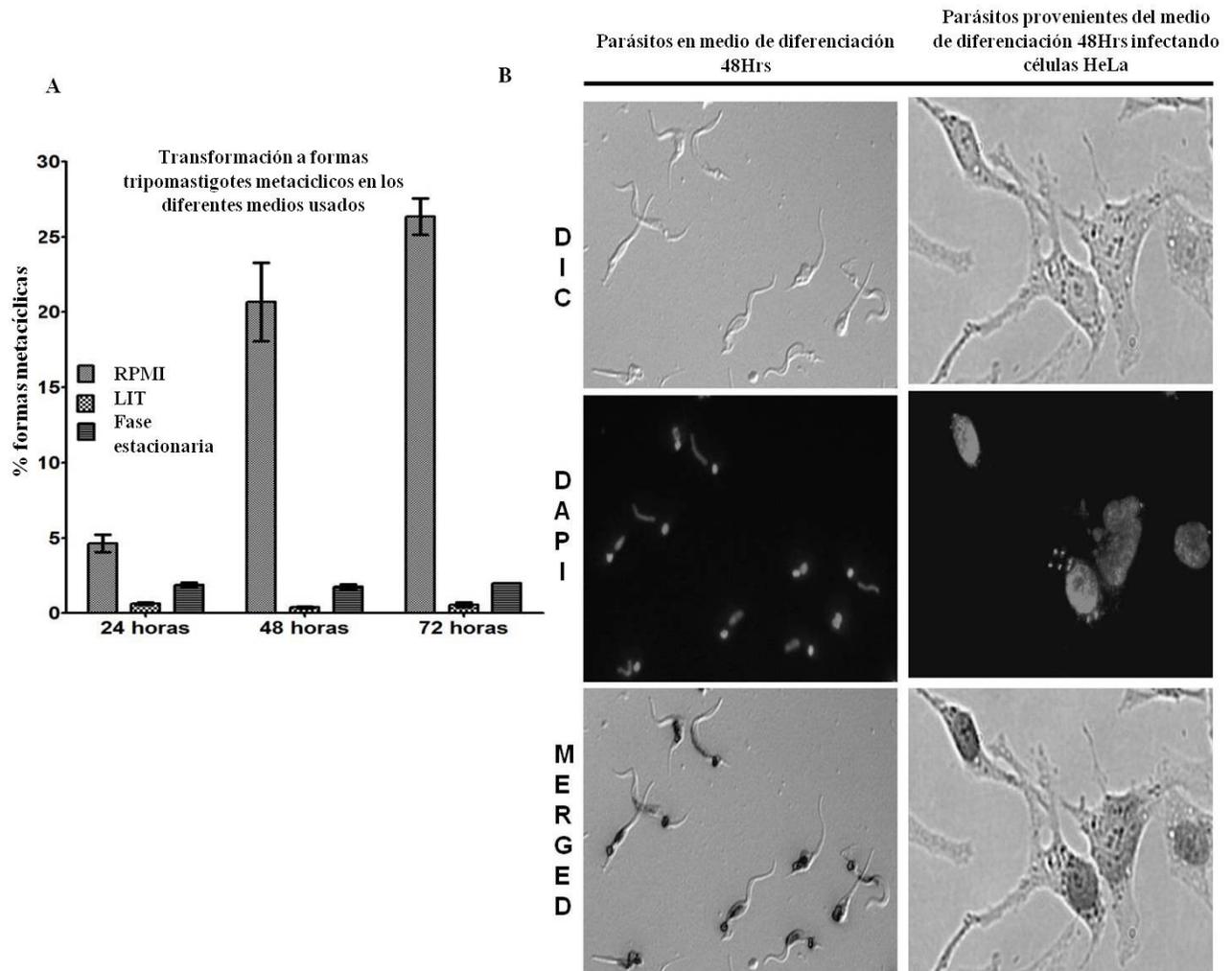


**Figura 24: Estudio de blancos predichos para las mitades 5'ARNt<sup>Asp</sup>.** (A). Predicción bioinformática con la herramienta en línea IntaRNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/v1/IntaRNA.jsp>) de las posibles regiones semilla par las mitades de ARNt en el 3' UTR del ARNm de los genes de interés. (B). *Western blot* para la validación de los genes estudiados como posibles blancos de las mitades de ARNt<sup>Asp</sup> y para un gen control (TcGAPDH) en las diferentes muestras: Sense: Parásitos transfectados con sondas de mitades 5' ARNt<sup>Asp</sup>; Antisense: Parásitos transfectados con sondas antisentido de mitades 5' ARNt<sup>Asp</sup>; Wt: parásitos sin transfectar, control.

### 3.6 Epimastigotes sometidos a stress nutricional producen gran nivel de microvesículas que liberan al medio.

Como mencionamos anteriormente y se reportó en (Garcia-Silva et al. 2010), el estrés nutricional es una de las condiciones optimas donde se inducen la mayor proporción de fragmentos derivados de ARNt y la formación de gránulos de ARN. Este estrés se puede reproducir incubando los parásitos en medio RPMI libre o con 1% de SBF por varios días. Por otro lado, este tipo de estrés nutricional ha sido reconocido como un factor importante que promueve la transformación hacia formas metacíclicas en *T cruzi* (Hernandez et al. 2012).

Por lo anterior, decidimos poner a punto un protocolo de purificación de microvesículas en un medio definido y sin SBF, donde la producción de las mismas sea considerable y que los parásitos sobrevivan. Como se muestra en la **Figura 25 A**, lo primero que observamos al dejar incubando por 72 Hrs los parásitos en RPMI sin SBF, fue un leve incremento a través de los días de las formas metacíclicas, por lo que lo llamaremos a este medio: medio de diferenciación. Por medio de este estrés se obtienen al cabo de 3 días cerca de un 30% de tripomastigotes metacíclicos en el cultivo. Posteriormente verificamos que estos parásitos que sufren este estrés y transformación son viables e infectivos, lo cual se puede apreciar en la **Figura 25 B**, donde se observan parásitos obtenidos luego de 2 días de diferenciación infectando células HeLa. A partir de este momento, este será el protocolo usado tanto para la obtención de microvesículas como para la observación al microscopio de la formación de gránulos de fragmentos de ARNt.



**Figura 25: Puesta a punto del medio de diferenciación y de producción de microvesículas.** (A). se observa la transformación a formas metacíclicas que sufren los epimastigotes de *T. cruzi* al ser cultivados en condiciones de estrés nutricional, en el medio de diferenciación; comparado con un cultivo normal en medio LIT y con un cultivo envejecido, en fase estacionaria (B). Observación al microscopio de los parásitos obtenidos con este protocolo, y verificación de su viabilidad y capacidad de infección en células HeLa.

Para verificar si los parásitos estresados por 48 horas en medio de diferenciación (Ee48) efectivamente secretan al medio microvesículas que contengan fragmentos derivados de ARNt y TcPIWI-tryp al medio, realizamos ensayos de microscopía electrónica de transmisión y de barrido de estos parásitos Ee48. Como se observa en la **Figura 26 A y B**, se eligieron como representantes de las imágenes de barrido observadas un parásito epimastigote estresado y otro metacíclicos, en los cuales se observan una gran cantidad de microvesículas a lo largo de todo el cuerpo parasitario. A primera impresión pareciera que la forma epimastigote estresada presenta mayor cantidad de microvesículas adheridas a su cuerpo que la forma metacíclica.

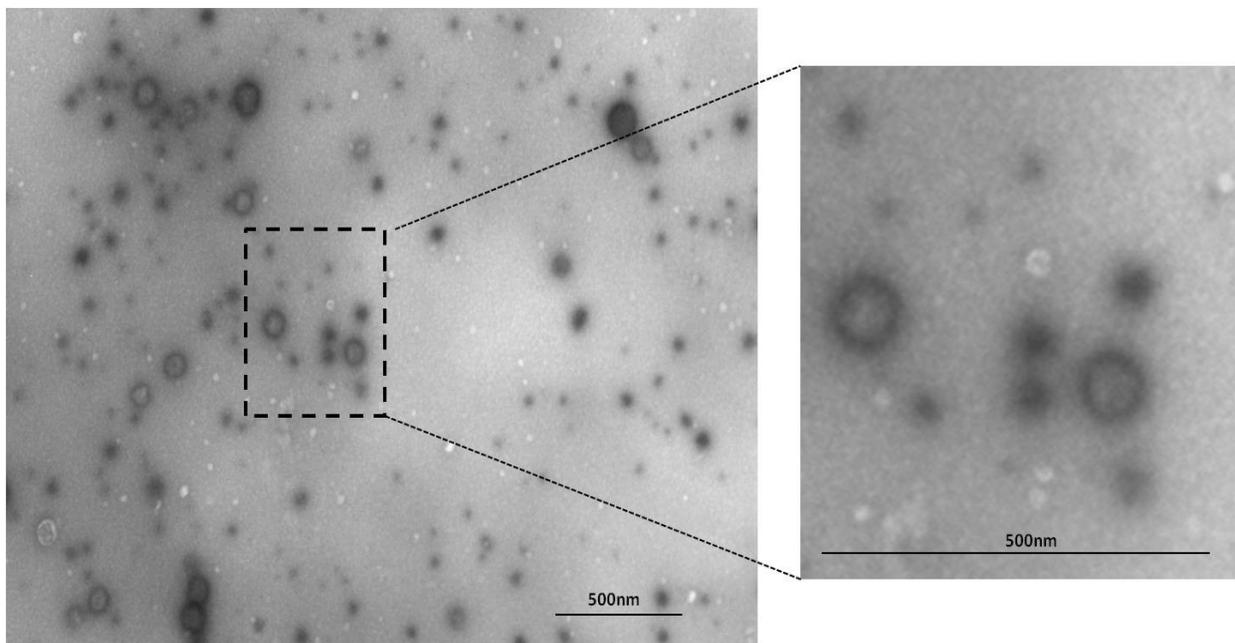
En las **Figuras 26 C-F** se muestran los resultados de los cortes de estos parásitos observados en microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes revelaron la presencia de microvesículas que están siendo liberadas a lo largo de todo el cuerpo celular, del bolsillo flagelar y del extremo posterior del parásito (**Figuras 26 C-D**). En la **Figura 26 E** se muestra como algunas veces las microvesículas adheridas el lado exterior a la membrana plasmática del parásito tienen el mismo tamaño que aquellas que se pueden observar dentro de los reservosomas (marcada con asterisco). Otra importante observación es que en este caso, el reservosoma muestra una región que pareciera estar tocando la membrana plasmática, entre los microtúbulos sub-pediculares, lo que podría sugerir que a este nivel podrían estar ocurriendo fenómenos de fusión de membranas. En la **Figura 26 F** se observa el bolsillo flagelar, como parecieran estar desprendiéndose del mismo una gran cantidad de microvesículas que pudieran estar liberándose al medio.



**Figura 26: Parásitos sometidos a estrés nutricional producen gran cantidad de microvesículas que liberan al medio. (A-B).** Microscopía Electrónica de Barrido de parásitos Ee48 sin diferenciado y diferenciado, alrededor de los cuales se observan microvesículas. **(C-F).** Microscopía Electrónica de Transmisión, cortes de parásitos ee48 mostrando las diferentes localizaciones donde se encuentran microvesículas, a lo largo de la membrana plasmática,

citostoma, reservosomas y bolsillo flagelar. (F, flagelo; K, kinetoplasto; R, reservosoma; N, Núcleo).

Por otro lado, decidimos realizar ensayos de microscopía electrónica de transmisión para verificar nuestro protocolo de purificación de microvesículas de este medio de diferenciación detallado en materiales y métodos. Como se observa en la **Figura 27**, se pudo determinar que el protocolo era eficiente para la purificación de microvesículas de secreción en *T. cruzi*. Se observaron microvesículas de diámetro heterogéneo que se encuentran entre 20 y 200 nm de diámetro. Estos resultados son similares a los que se ha reportado para microvesículas de secreción de células de mamífero, tanto *in vitro* como *in vivo*, donde la heterogeneidad se debe a sus diferentes orígenes (Camussi et al. 2010; Mathivanan et al. 2010).



**Figura 27:** Verificación por microscopía electrónica de transmisión de la fracción purificada de microvesículas secretadas por *T. cruzi*. Se observa una gran heterogeneidad en tamaños que van desde 20-200nm de diámetro. Se muestra una ampliación de una sección para ver claramente la continuidad de la bicapa electrón-densa que rodea las microvesículas purificadas.

### **3.7 El perfil de los sARNs cargados en microvesículas secretadas por *Trypanosoma cruzi* revela la existencia de una firma molecular específica para la fracción extracelular.**

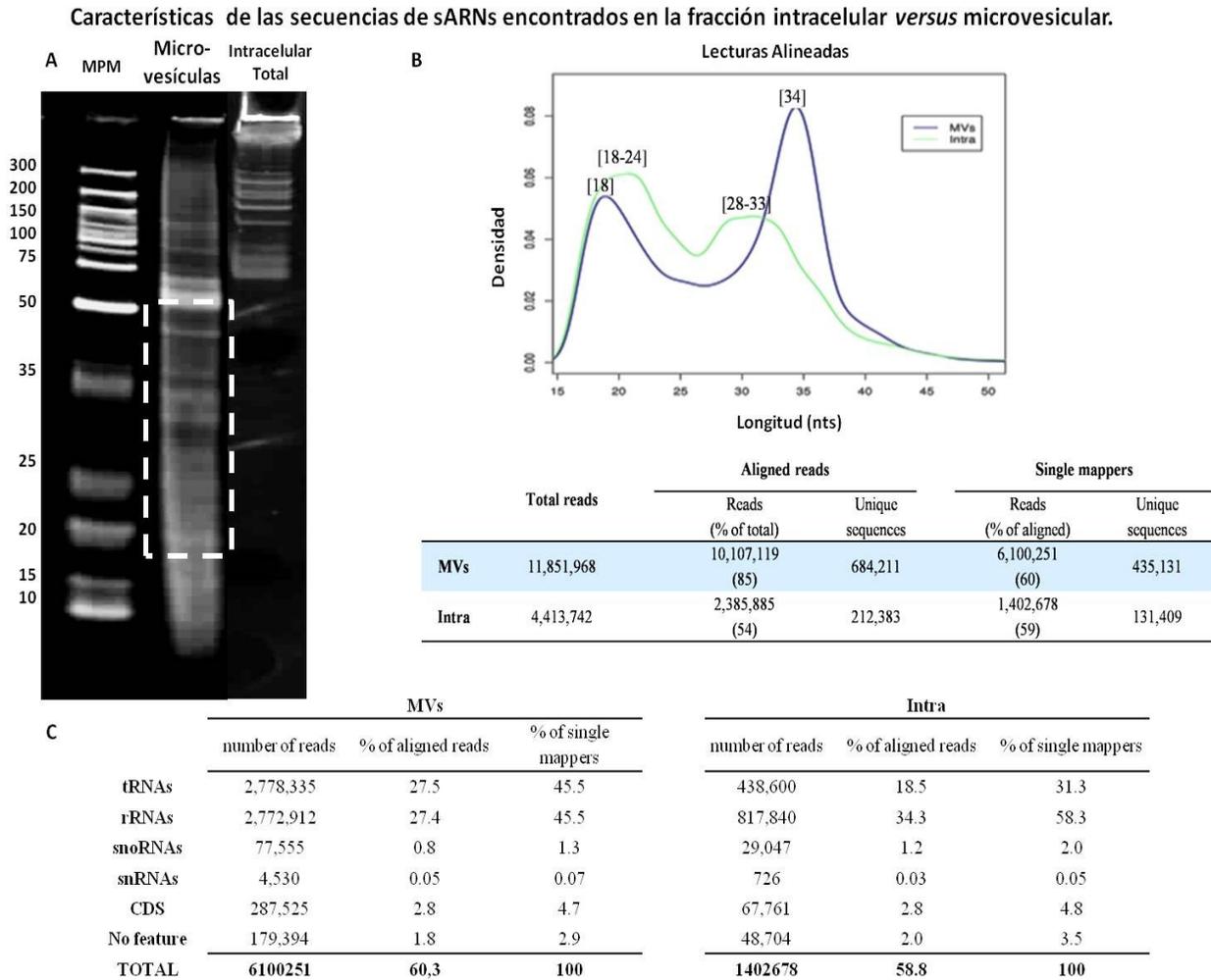
Con el objetivo de conocer el perfil completo de sARNs contenido en las microvesículas secretadas, realizamos una extracción de ARN de dichas microvesículas para su posterior análisis. Como primera observación se revela que el ARN contenido en microvesículas se encuentra enriquecido en ARNs pequeños cuando se lo compara con el ARN intracelular. Posteriormente decidimos realizar un secuenciado masivo de una librería de ADNc de entre 18-60 nts del ARN contenido en dichas microvesículas (**Figura 28 A**).

El análisis de las secuencias se llevo a cabo en la Unidad de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo. Las bibliotecas de ADNc de sARNs intracelular *versus* extracelular se prepararon a partir de las muestras de los correspondientes sARNs obtenidos utilizando el kit de preparación de muestras de v1.5 de illumina Inc y secuenciado en una plataforma Genome Analyzer II platform (Illumina Inc.). La secuenciación dio lugar a un total de 11.851.968 y 4.413.742 de lecturas para los esRNAs y fracciones intracelulares, respectivamente (**Figura 28 B**). Los datos de secuenciado se alinearon por separado con cada uno de los haplotipos de *T. cruzi* CL Brener (no- Esmeraldo y Esmeraldo ) y con una base de contigs sin asignar. Este análisis dio lugar a un total de 10.107.119 lecturas (85 %) y 2.385.885 lecturas (54 %) de alineado lee las MVs y fracciones intracelulares respectivamente. Al comparar el rango de longitud y el tamaño de las secuencias se observo una distribución bimodal, con picos en la mediana de ~ 18-22 nt y ~ 34 nt. Proporciones similares de alineado se observaron para las fracciones intracelulares y microvesicular (~ 60 %) asignados a una sola ubicación en el genoma de referencia (“*single mappers*”) en la **Figura 28 B**.

En la **Figura 1 del Material Suplementario 3** se observa la distribución del total de secuencias alineadas compartidas o específicas para cada haplotipo de *T. cruzi*. Un análisis gráfico revela una distribución muy similar de las lecturas entre los genomas Esmeraldo y no Esmeraldo, mientras que el perfil de la distribución de los " sin asignar " fue significativamente diferente con un patrón de distribución más difuso. Si se consideran solamente las secuencias que se alinean de manera única con los genomas Esmeraldo y no Esmeraldo, ~ 90 % de los sARNs contenidos en microvesículas extracelulares derivan de ARNr ( srRNAs ) y de transferencia ( tsRNAs ) con 45,5 % para cada uno (**Figura 2 Material Suplementario 3**). Las lecturas restante derivan de secuencias codificantes (4,7 %), snoRNAs (1,3 %), ARNsn (0,07 %) y a regiones no asignadas del genoma (2,9 %). La categorización funcional de su contraparte intracelular es similar con los niveles más altos también para srRNAs y tsRNAs que representan 58,3 % y 31,3 %, respectivamente.

Sin embargo, un análisis más detallado de las diferentes categorías reveló diferencias significativas entre microvesículas y compartimentos intracelulares. Como se representa en la

**Figura 2 del Material Suplementario 3**, la longitud media y la distribución del largo de tsRNAs revelaron la existencia de una población casi exclusiva de tsRNA contenida en las microvesículas con una longitud media de 34 nt, mientras que los tsRNAs intracelulares aparecieron distribuidos en al menos dos poblaciones principales con tamaños que van desde 19 a 23 nt y 30 a 37 nt (longitud media de 22 y 34 nt respectivamente). Por lo tanto, los tsRNAs intracelulares correspondientes a una longitud media de 22 nt fueron específicamente excluidos de las microvesículas.



**Figura 28: Caracterización de los pequeños ARNs contenidos en microvesículas secretadas por *T. cruzi* versus fracción intracelular. (A).** Gel desnaturalizante de poliacrilamida 15% tenido con SYBRGold para la detección del ARN purificado de las microvesículas obtenidas. **(B).** Representación gráfica de la distribución del largo de las secuencias vs el número de lecturas encontradas como secuencias únicas. **(C).** Categorización de las lecturas encontradas de acuerdo a las diferentes clases genómicas.

Un análisis detallado de los precursores de ARNt y el brazo del cual derivaron estos fragmentos reflejaron grandes diferencias cuali-cuantitativa entre las dos fracciones estudiadas (**Tablas 1 y 2 Material Suplementario 3**). Por ejemplo, cinco principales precursores de ARNt generaron más del 95 % de tsRNAs (Leu , Thr , Glu , Arg Gly y Val ) en la fracción microvesicular. Por otro lado, un análisis comparativo entre fracciones reveló que los niveles de tsRNAs Thr se observaron exclusivamente en las microvesículas mientras que tsRNAs Leu y Arg estaban presentes en la población intracelular de 34 nt en niveles más o menos similares, sin diferencias significativas en la proporción de derivados 5' y 3'. A pesar de que los fragmentos derivados de Glu, Gly y Val son también abundantes en la fracción intracelular, sólo se observan como fragmentos más cortos de 20-22 nt de longitud . Por lo tanto, los tsRNAs contenidos en microvesículas difieren de los intracelulares por lo menos en una de las siguientes propiedades: tamaño, precursores de ARNt más abundantes y la relación de fragmentos generados a partir de las mitades 5' y / o 3'.

La distribución del tamaño de srRNAs también fue diferente cuando se comparan los dos compartimentos (**Figura 2 Material Suplementario 3**). Los srRNAs intracelulares mostraron tres poblaciones principales representadas por picos a los 19, 29 y 36 nt , mientras que en las microvesículas no se observa claramente la población de 29 nt, sin embargo, la población de 19 nt mostró una mayor densidad de fragmentos. Un análisis detallado de estas secuencias ( **Figura 3 Material Suplementario 3**) reveló que tanto srRNAs microvesiculares como intracelulares derivan de una región discreta similar a partir de diferentes genes de ARNr y no parecen ser consecuencia de degradación inespecífica. Sorprendentemente, el patrón de srRNAs microvesiculares incluye fragmentos ausentes desde el compartimiento intracelular y fragmentos similares, pero con diferencias pronunciadas en su abundancia relativa en comparación con los intracelulares (**Figura 3B Material Suplementario 3**). Estos datos sugieren que los srRNAs presentes en las vesículas extracelulares no son productos de degradación al azar sino que se seleccionan activamente por un mecanismo que aun es desconocido. De hecho, algunos srRNAs que estaban ausentes en la fracción intracelular eran muy abundantes en la fracción de microvesículas.

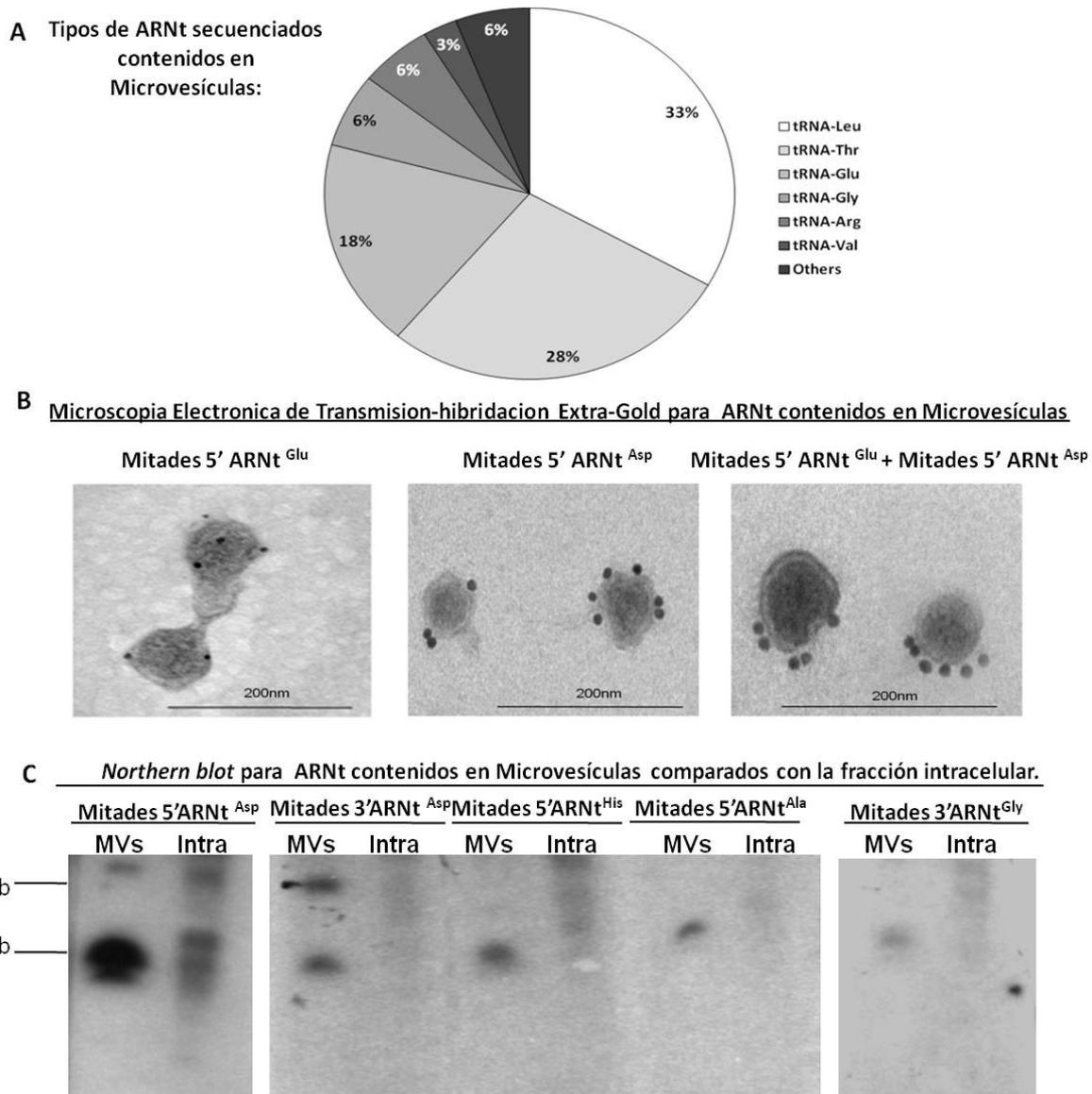
Como se representa en **la Figura 2 Material Suplementario 3**, los fragmentos derivados de snoRNA representaron el 1,3 % y 2 % para microvesículas y fracción intracelular, respectivamente. La distribución del tamaño de lecturas revela diferencias entre los dos compartimentos (**Figura 4 Material Suplementario 3**). Las secuencias derivadas de snoRNA en microvesículas presentaron tres poblaciones principales con picos de 26 , 28 y 34 nt en contraste con los de la fracción intracelular con dos poblaciones que tienen picos de 33 y 35 nt . Sorprendentemente, un análisis conjunto reveló que > 99 % de las secuencias en microvesículas derivan de snoRNA de la subfamilia H /ACA mientras que la mayoría de los fragmentos intracelulares derivan de la subfamilia C/D. Para el caso de las secuencias derivadas de CDS, contrariamente a lo esperado para productos de degradación, se observó que la mayoría de las

lecturas derivan de regiones discretas de varios CDS con una densidad relativamente alta (**Figura 5 Material Suplementario 3**).

A partir de todo este análisis es de destacar en lo que concierne a fragmentos derivados de ARNt que están siendo secretados, que aproximadamente el 90% de las lecturas de ~33 nt correspondían a estos fragmentos derivados de ARNt. A su vez, dentro de estos, más del 90% derivan de un grupo restringido de 6 ARNt: Leu, Thr, Glu, Gly y Arg (**Figura 29 A**). Este grupo es diferente al encontrado para el clonado y secuenciado masivo realizado anteriormente para la fracción intracelular, donde predominaban los fragmentos derivados de Asp y Glu. Estos datos podrían estar indicando que estas moléculas están siendo activamente incorporadas en las microvesículas de secreción en un proceso controlado más que por un mecanismo al azar o no-específico.

Por la heterogeneidad presentada en esta purificación de microvesículas secretadas por *T. cruzi*, nos interesa determinar si nuestras mitades de ARNt estaban presente en algún tipo particular de microvesículas, por ejemplo en las menores de 100nm. Para ello realizamos ensayos de hibridación e inmunodetección con oro de mitades de ARNt de Asp y Glu y de TcPIWI-tryp. En la **Figura 29 B** se muestran los resultados para estos ensayos donde pudimos confirmar que tanto las mitades 5' de ARNt como TcPIWi-tryp están siendo incorporadas en las microvesículas secretadas por *T. cruzi* con un diámetro menor a 100nm.

Por otro lado con este mismo objetivo realizamos ensayos de *Northern blot* para detectar mitades de ARNt de Asp, His, Ala y Gly. Como se observa en la **Figura 29 C**, pudimos detectar la presencia de todas las mitades de ARNt estudiadas tanto en microvesículas como en la fracción de ARN intracelular. Los resultados obtenidos por Northern blot revelan lo observado en el secuenciado y en los perfiles de ARN de microvesículas. En la **Figura 29 C** se puede apreciar que el patrón de bandas que aparecen en las diferentes fracciones para un mismo fragmento de ARNt es variable. A su vez, las mitades de ARNt se encontraron en mayor concentración contenidas en las microvesículas. Para el caso de mitades 3' derivadas del ARNt Gly, por ejemplo, casi no se observa señal en la fracción intracelular, observándose una banda clara para la fracción correspondiente a microvesículas. Al igual que lo mencionado para los diferentes tipos de ARNt encontrados en la fracción intracelular *versus* microvesículas, esto indicaría que por algún mecanismo las mitades de ARNt que se producen intracelularmente en el citoplasma son incorporadas activa y específicamente en las microvesículas para su secreción al medio extracelular.



**Figura 29: Estudio de la presencia de fragmentos derivados de ARNt y TcPIWI-tryp en microvesículas secretadas por *T. cruzi*.** (A). Distribución de las secuencias encontradas para ARNt entre los diferentes tipos de ARNt. (B). Validación por hibridación e inmunodetección con oro en microscopía electrónica de transmisión de la presencia en las microvesículas de las mitades de ARNt estudiadas y de TcPIWI-tryp. (C). Ensayos de *Northern blot* para la validación de mitades de ARNt encontradas en microvesículas. Se observan resultados obtenidos para las diferentes sondas usadas en dos fracciones diferentes: Intra: Intracelular y MVs: Microvesículas secretadas por *T. cruzi*.

### 3.8 El contenido proteico y de sARNs de las microvesículas es diferente entre cepas de *T. cruzi*: Brener, Dm28c e Y.

La variabilidad en el espectro de diferentes cepas y tipos de *T. cruzi* ha dificultado su clasificación y nomenclatura en el correr de los años. Diferentes esfuerzos se han hecho para poder encontrar marcadores taxonómicos que se relacionen con las diferencias en la manifestación clínica de la enfermedad y de la distribución geográfica de dichos parásitos, por ejemplo. Una última versión de un intento de clasificación se encuentra en (Zingales et al. 2009).

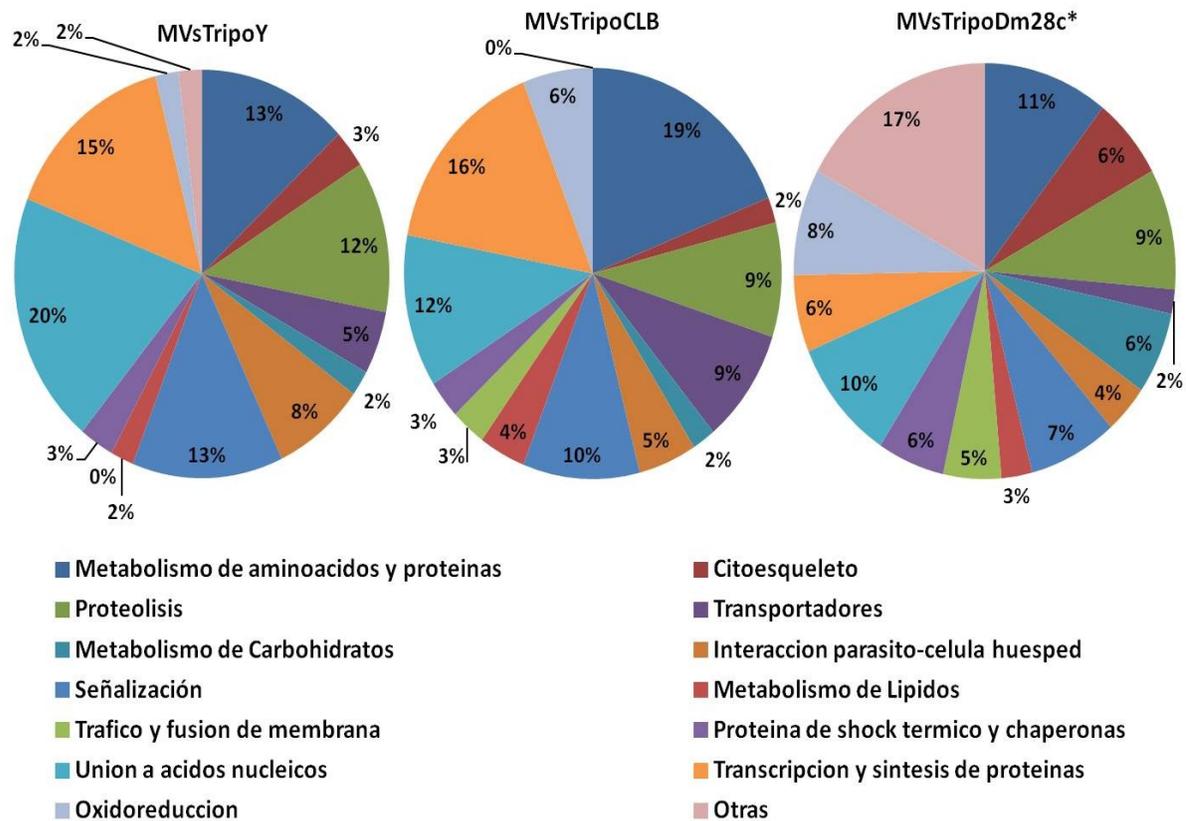
En el presente trabajo realizamos ensayos proteómicos y transcriptómicos de pequeños ARNs contenidos en microvesículas secretadas por diferentes cepas de *T. cruzi*. Estos ensayos se realizaron con el fin de detectar si las diferencias fenotípicas que se observan entre estas cepas, principalmente en cuanto a su capacidad de infección y su virulencia podrían reflejarse de alguna manera en el contenido de microvesículas secretadas por el estadio infectivo de las mismas. Se eligieron tres representantes de algunos de los diferentes tipos de *T. cruzi* que se reconocen actualmente: *T. cruzi* cepa Y (Tipo II), *T. cruzi* clone CL-Brener (Tipo VI) y *T. cruzi* clon Dm28c (Tipo I) (Zingales et al. 2009).

Comenzamos realizando estudios proteómicos y transcriptómicos de sARNs de muestras de microvesículas secretadas por tripomastigotes de *T. cruzi* del clon CL-Brener y cepa Y; los resultados del clon Dm28c que se usaron para la comparación proteica fueron los publicados por Almeida IC et al, 2013 (Bayer-Santos et al. 2013), para el transcriptoma los hallados en nuestro trabajo para epimastigotes estresados. Este trabajo se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. Wanderley de Souza y la Dra. Thais Souto-Padron de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), para la purificación de tripomastigotes de las diferentes cepas. Los ensayos de proteómica se llevaron a cabo en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UByPA) del Institut Pasteur de Montevideo, por el Dr. Carlos Bathyany.

Los resultados del análisis proteómico obtenido para las microvesículas de tripomastigotes de las diferentes cepas de *T. cruzi* se muestran en la **Figura 30**. Para simplificar el análisis decidimos comparar los resultados encontrados al nivel de la distribución de categorías funcionales de las proteínas identificadas. Como se observa en el análisis comparativo, no se aprecian diferencias significativas entre las categorías funcionales de las proteínas contenidas en microvesículas de tripomastigotes de *T. cruzi* de las cepas CL-Brener, Dm28c e Y. Siendo para ambas cepas las vías más representadas las que corresponden a unión a ácidos nucleicos y metabolismo de aminoácidos y proteínas. A nivel de proteínas un análisis preliminar de la lista obtenida por UByPA tampoco reveló diferencias significativas entre muestras. La lista de este análisis se encuentra en **Material Suplementario 1**.

Estos resultados indicarían que el contenido proteico de las microvesículas secretadas por las diferentes cepas de *T. cruzi* es muy similar, no pudiéndose explicar “a priori” las diferencias observadas dentro de esta especie por diferencias en estos elementos.

Categorías Funcionales de las proteínas identificadas en las microvesículas secretadas por diferentes cepas de tripomastigotes de *T. cruzi*



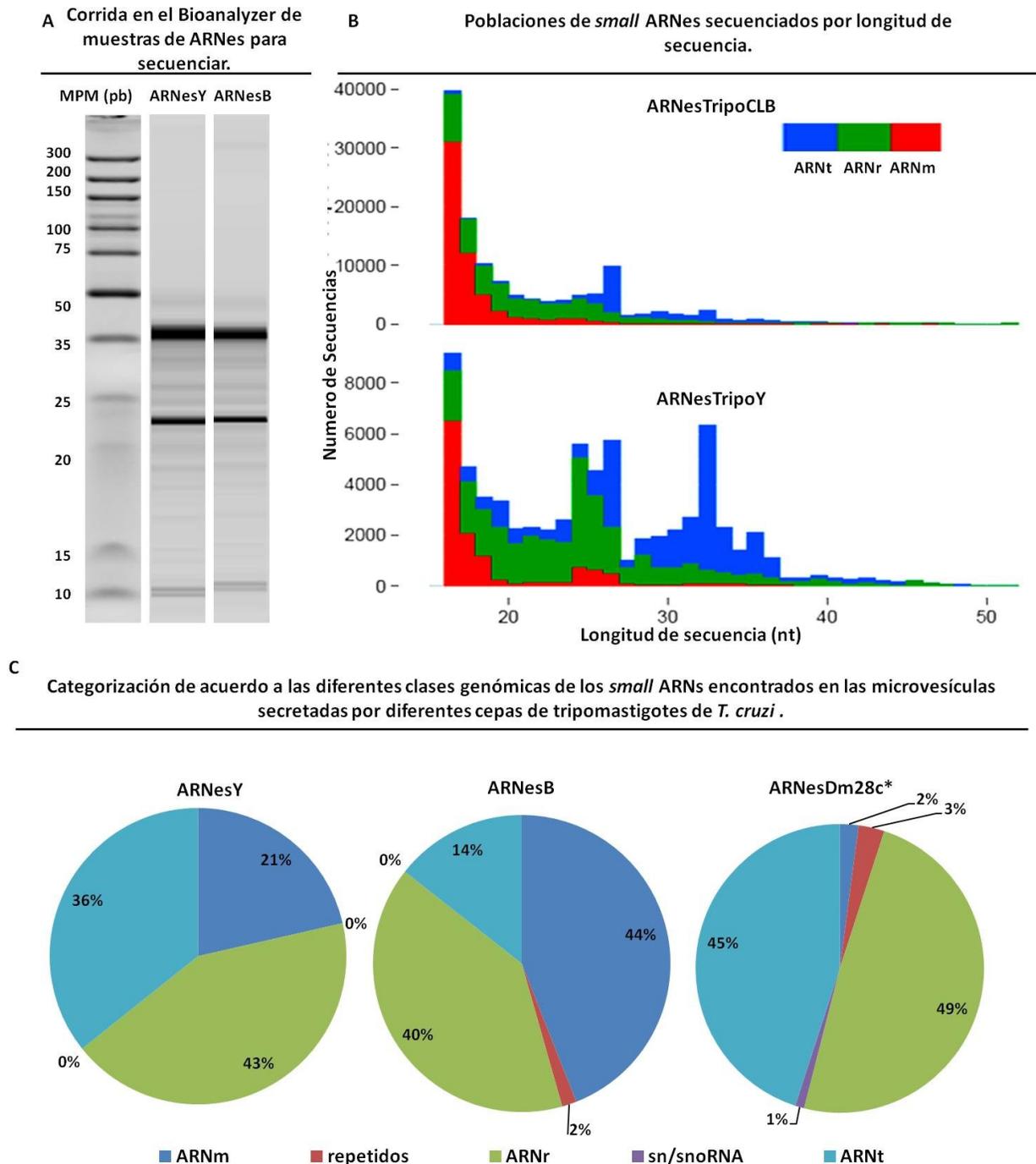
**Figura 30: Comparación de categorías funcionales en las cuales se clasifican las proteínas contenidas en microvesículas secretadas por tripomastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi*.** Una lista preliminar de las proteínas con las cuales se realizó la categorización para CL-Brener e Y se encuentra en Material Suplementario 1. Los análisis se hicieron en base a literatura y su anotación en Blast2GO. \* Para Dm28c se usaron los resultados mostrados en Almeida IC et al, 2013(Bayer-Santos et al. 2013).

Al análisis proteómico del contenido de microvesículas le siguieron ensayos de transcriptoma para caracterizar las poblaciones de sARNs presentes en las microvesículas secretadas por las diferentes cepas. Para esto realizamos extracción de sARNs del pellet de microvesículas con TRIzol y observamos el perfil de las muestras obtenidas para los ARN extracelular secretados (ARNes) obtenidos para las cepas CL-Brener e Y. Como se observa en la **Figura 31 A**, la corrida obtenida en el Bioanalyzer fue similar para ambas muestras, revelando un enriquecimiento en sARNs similar a lo observado para el ARN contenido en microvesículas de Dm28c y detallado anteriormente.

El secuenciado masivo de estas muestras revelo que las poblaciones de ARN contenidas en dichas microvesículas varían entre muestras. Como se aprecia en la **Figura 31 B**, cuando se realiza un análisis de las poblaciones de sARNs presentes diferenciadas por longitud de secuencia se observó que los perfiles entre cepas son levemente diferentes. Para los fragmentos derivados de ARNm no se observan diferencias, presentando para ambas muestras un perfil similar a lo que se espera como resultado de degradación por ribonucleasas. Por otro lado la distribución correspondiente a fragmentos derivados de ARNr y ARNt parece ser diferente entre cepas. CL-Brener presenta un perfil de fragmentos derivados de ARNr sin picos pronunciados, lo que refleja una distribución similar a la de degradación, sin embargo para los fragmentos derivados de ARNt se observo un pico de clivado específico en la región de ~27nts. En el caso de Y, tanto los fragmentos derivados de ARNr como de ARNt presentan picos característicos de clivados específicos. Siendo para los fragmentos derivados de ARNr entre ~25-27nts y para los derivados de ARNt dos picos uno correspondiente a secuencias más cortas de ~25-27nts y otro correspondiente a secuencias más largas de ~33nts.

A continuación se analizaron en detalle la carga correspondiente en las microvesículas para cada tipo de ARN y se observó que la composición de ARN es similar entre cepas no así la abundancia relativa de cada clase genómica de sARNs contenidos en las mismas. Como se observa en la **Figura 31 C**, los ARNes presentes en microvesículas de la cepa Y se integran principalmente por fragmentos derivados de ARNr, para CL-Brener es casi 50% para fragmentos de ARNm y de ARNr y para Dm28c es un panorama similar 50-50% pero en este caso para fragmentos derivados de ARNt y ARNr.

Como conclusión general de estos análisis se puede contemplar que a nivel del contenido de microvesículas secretadas por diferentes cepas de *T. cruzi*, se observan diferencias en el contenido génico de sARNs presente en las microvesículas secretadas pero no así en la carga proteica de las mismas. Más estudios deben realizarse para poder concluir si estas diferencias observadas a nivel transcriptómico del secretoma tienen algún impacto en las diferencias fenotípicas observadas entre las cepas estudiadas.

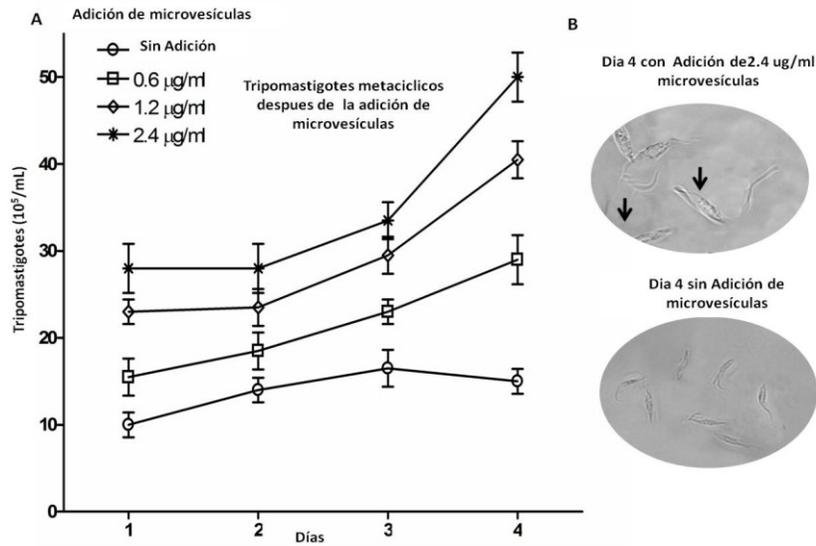


**Figura 31: Análisis transcriptómico del contenido de sARNs presente en microvesículas secretadas por tripomastigotes de diferentes cepas de *T. cruzi*.** (A). Perfil obtenido por el Bioanalyzer de las diferentes muestras de ARNs a secuenciar. (B). Distribución de las secuencias obtenidas según longitud de las secuencias y clase funcional. (C). Categorización en clases genómicas de las secuencias contenidas en las microvesículas. \* Resultados de Dm28c más detallados en secciones anteriores de este texto.

### 3.9 Las microvesículas secretadas por *T. cruzi* promueven la metaciclogénesis.

Como hemos mencionado previamente, pareciera que la generación de fragmentos derivados de ARNt y la formación y tamaño de gránulos citoplasmáticos donde son reclutados fueran dos fenómenos que se incrementan cuando se somete a estrés nutricional a epimastigotes de *T. cruzi*. Este tipo de estrés nutricional como indicamos previamente también, es considerado un estímulo relevante para la progresión del ciclo de vida del parásito, el cual de alguna forma censa este estado cuando atraviesa el tracto digestivo del insecto vector. Estos estímulos producen en el parásito una serie de cambios que lo llevarán a su diferenciación a la forma tripomastigote metacíclico. En este punto, nos planteamos la hipótesis que las microvesículas secretadas por el parásito en el medio de diferenciación podrían estar implicadas en este proceso de metaciclogénesis.

Para poder aproximarnos a resolver esta pregunta expusimos epimastigotes de *T. cruzi* a niveles crecientes de microvesículas purificadas de Ee48 y se contó el número de formas tripomastigotes metacíclicos que aparecían en cultivo. Se intento incrementar los niveles de microvesículas unas 5 a 10 veces los niveles de cultivo normales. Como se observa en la **Figura 32 A** con el correr de los días el nivel de formas metacíclicas que aparecieron se correlacionaron con el nivel o concentración de microvesículas adicionadas al medio de cultivo. En estas condiciones experimentales, luego de 4 días y a la mayor concentración de microvesículas utilizada se incremento en 2-3 veces el nivel de metacíclicos en cultivo comparado con el ensayo control sin adición de microvesículas, y una imagen representativa de la población de parásitos obtenida se muestra en la **Figura 32 B**.



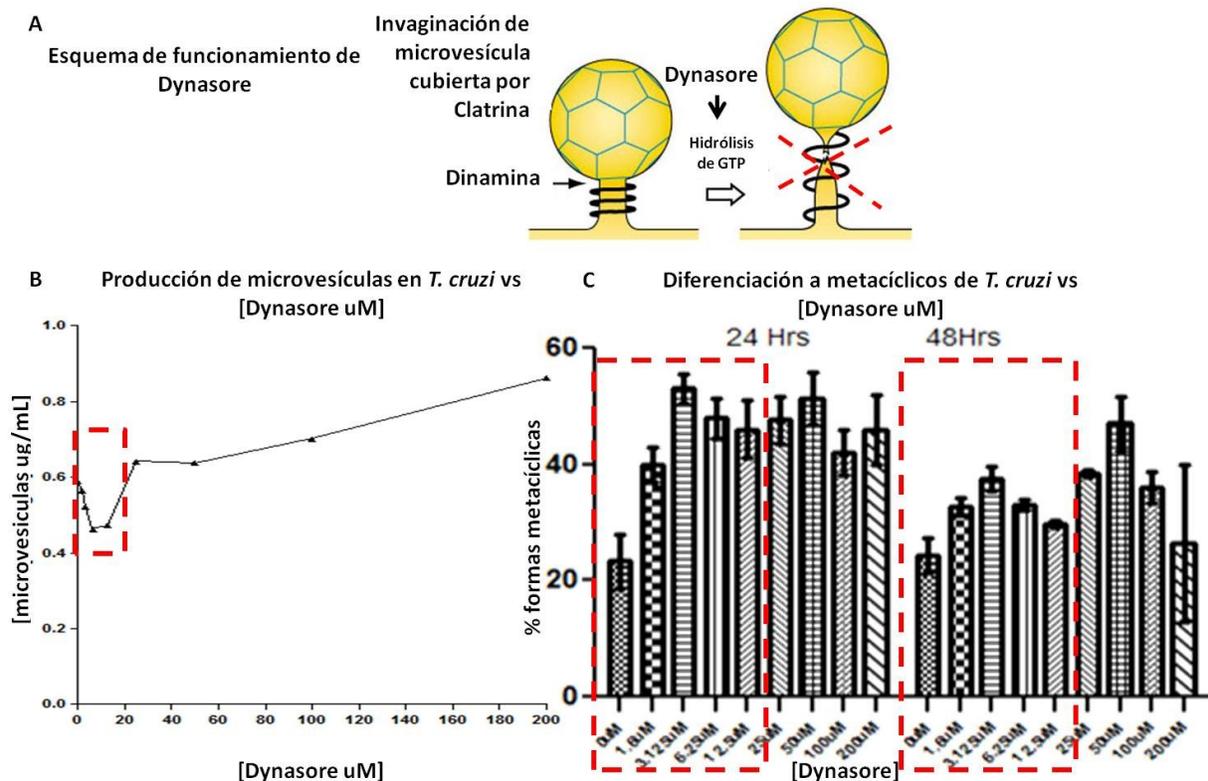
**Figura 32: La adición exógena de microvesículas secretadas por *T. cruzi* incrementa la metaciclogénesis en cultivos normales. (A).** Epimastigotes de *T. cruzi* en fase estacionaria fueron cultivados en medio RPMI sin SBF por 4 días mientras fueron expuestos a niveles crecientes de microvesículas purificadas de Ee48 (expresadas como µg de proteínas). Los resultados mostrados son el número total de formas metacíclicas por mL obtenidas en los diferentes tiempos. **(B)** Imágenes de microscopía óptica de campo claro mostrando los parásitos obtenidos al cabo del cuarto día de ensayo, donde se observan epimastigotes muy alargados y metacíclicos en la muestra con microvesículas comparando con el control.

A continuación intentamos determinar alguno de los factores que pudieran estar involucrados en este proceso de incorporación del contenido de microvesículas en el parásito. Nos propusimos principalmente establecer si Clatrina, podría ser uno de estos factores, dado que por un lado ya la habíamos encontrado anteriormente relacionada con las mitades de ARNt y con TcPIWI-tryp y por el otro; es un elemento clave en la endocitosis mediada por microvesículas como ya hemos mencionado.

Para poder abordar esta pregunta decidimos utilizar Dynasore, que es un inhibidor de GTPasas cuya blanco celular es Dinamina, y por lo tanto bloquea la endocitosis mediada por Dinamina. La Dinamina es la responsable de formar una espiral alrededor del cuello que se forma cuando una microvesícula es invaginada en la membrana plasmática. La misma “aprieta” este cuello mediante la hidrólisis de GTP, haciendo que la microvesícula se libere de la membrana. Por lo tanto indirectamente estaríamos inhibiendo la endocitosis de microvesículas cubiertas por Clatrina (**Figura 33 A**). La relación de Dynasore y *T. cruzi* ha sido estudiada anteriormente, los autores de este trabajo determinaron la importancia de Dinamina en la entrada del parásito en la célula huésped (Barrias et al. 2010).

Para llevar a cabo nuestros ensayos primero decidimos determinar y poner a punto si existía una concentración de Dynasore a la cual se inhibía, o se modificaba de alguna manera la secreción de microvesículas en *T. cruzi*. Como se muestra en la **Figura 33 B**, al incubar el mismo número de parásitos en dosis crecientes de Dynasore, la producción de microvesículas se vió disminuida en un rango entre 1,5  $\mu\text{M}$  y 12,5  $\mu\text{M}$ , viéndose posteriormente aumentada a mayores concentraciones de inhibidor. Estos ensayos se realizaron midiendo cantidad de proteínas en el pellet de purificación de microvesículas del sobrenadante de cultivo. Paralelamente se observaron la producción de gránulos de mitades de ARNt por FISH en los parásitos y no se observaron grandes cambios en los mismos.

Con respecto a cómo afecta la inhibición mediada por Dynasore la metaciclogenesis, decidimos contar el porcentaje de formas metacíclicas que aparecían en los diferentes cultivos expuestos a las dosis crecientes de Dynasore, a las 24 y 48 horas. El resultado de estos conteos se muestra en la **Figura 33 C**, donde se puede observar que en el rango de droga donde la producción de microvesículas se vió disminuida la metaciclogenesis también, aumentando en los rangos donde la producción de microvesículas también aumentaba. Pero a grandes rasgos, las diferencias observadas no resultaron significativas, por lo que se debería seguir con estos experimentos, para ver la real implicancia de la Dinamina en estos fenómenos.

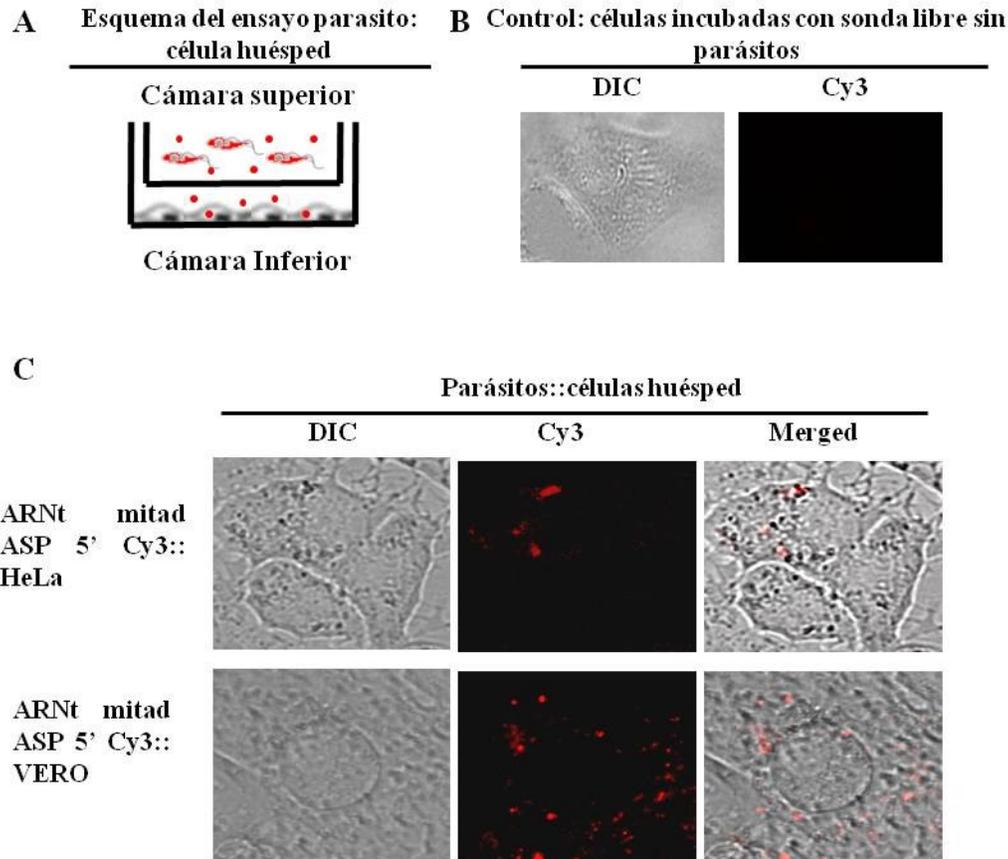


**Figura 33: Efecto de Dynasore en la metaciclogenesis de *T. cruzi*.** (A). Se muestra un esquema del nivel al que actúa Dynasore, inhibiendo la Dinamina y evitando al invaginación de las

microvesículas desde la membrana plasmática (modificado de [www.endocytosis.org](http://www.endocytosis.org)). **(B)**. Cuantificación de la producción de microvesículas en  $\mu\text{g/mL}$  vs concentración de Dynasore usada. **(C)**. Conteo del porcentaje de formas metacíclicas que aparecen en cultivo a las 24 y 48 Hrs de expuestos a concentraciones crecientes de Dynasore (rangos usados 0-200 $\mu\text{M}$  en diluciones seriadas)

### **3.10 Los pequeños ARNs contenidos en microvesículas secretadas por *T. cruzi* son transferidos a sus células huésped susceptibles.**

Equivalente a los ensayos realizados para analizar si el contenido de microvesículas era transferido entre parásitos, se realizaron experimentos de *transwells* para analizar en este caso la transferencia de material entre parásitos y su célula huésped. Se usó el esquema mostrado en la **Figura 34 A**, donde en la cámara superior se encuentran parásitos marcados con sonda fluorescente que secretan microvesículas marcadas al medio que atravesaran el filtro y pasaran a la cámara inferior donde se encuentran las células de mamífero a ser evaluadas (HeLa y Vero). En la **Figura 34 B** se observa el control, donde las células fueron cultivadas con sonda marcada libre de microvesículas y no se observa la incorporación de la misma en las condiciones empleadas para estos ensayos. Por otro lado, sorprendentemente, cuando se co-incuban los parásitos, marcados con las células HeLa y/o Vero, las mismas muestran una clara incorporación de la señal fluorescente cuando se las observa, adoptando dicha señal una distribución perinuclear y citoplasmática clara (**Figura 34 C**). Estos ensayos demuestran que el contenido de microvesículas secretadas por *T. cruzi* está siendo transferido además de entre parásitos, desde parásitos a su célula huésped.

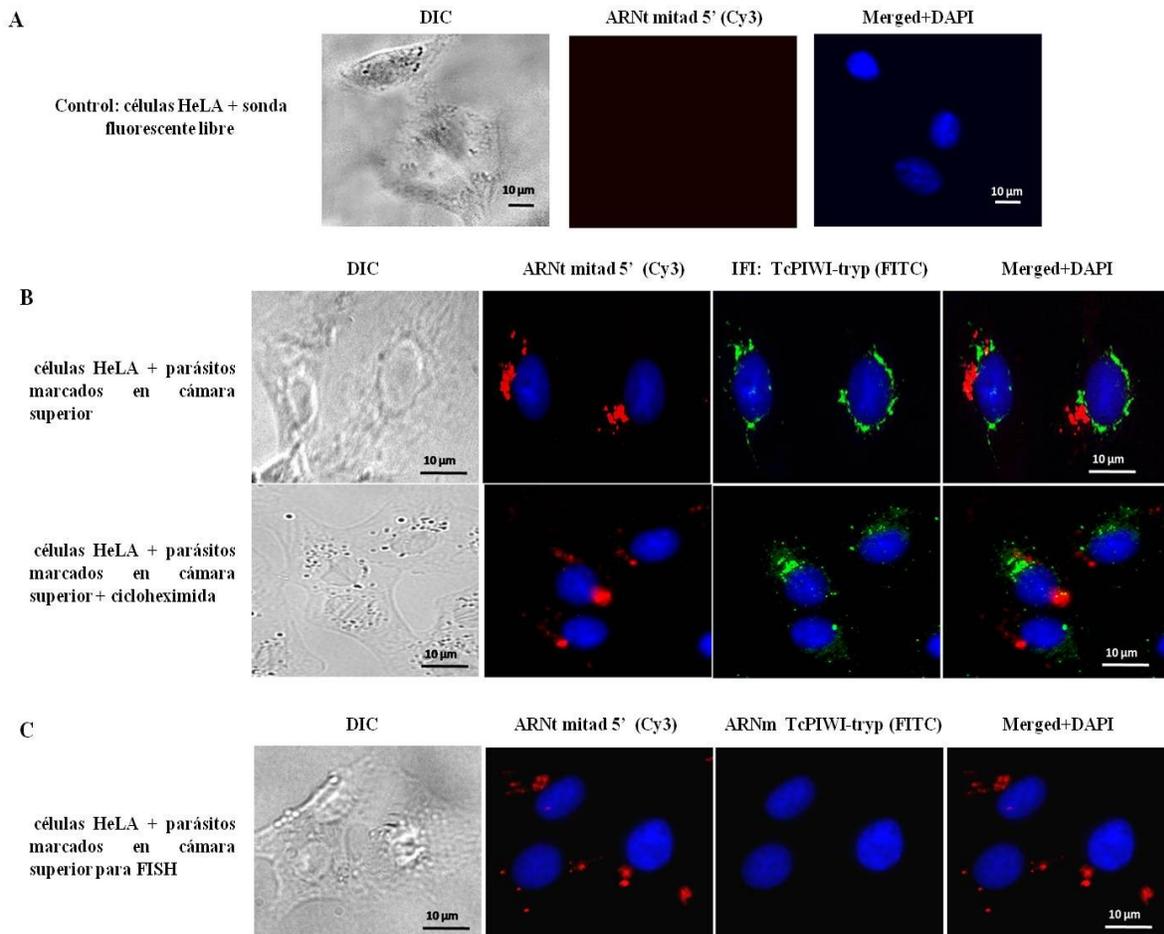


**Figura 34: Intercambio de mitades de ARNt a través de microvesículas de parásitos a su célula huésped.** (A) Esquema de *transwell* utilizado para los ensayos. Se siguió la señal de fluorescencia en la cámara inferior. (B). Control: células incubadas en presencia de sonda fluorescente libre, donde no se observa incorporación de la señal. (C) Resultados de los Ensayos con *transwells* del esquema usado observado al microscopio, donde la fluorescencia se observó transferirse de la cámara superior a la inferior a través del filtro.

Como habíamos mencionado anteriormente, ambos elementos estudiados: mitades de ARNt y TcPIWI-tryp se encuentran contenidos en las microvesículas secretadas por *T. cruzi*, por lo que una vez demostrada la transferencia de las mitades de ARNt entre parásitos y células nos preguntamos si TcPIWI-tryp se comportaba de la misma manera. Para responder esta pregunta co-cultivamos microvesículas marcadas de *T. cruzi* con células HeLa y como control de transferencia de material seguimos las mitades de ARNt. En la **Figura 35 A** se muestra nuevamente el control con sonda libre que no es incorporada por la célula.

En la **Figura 35 B** se puede apreciar en el panel superior la detección de la proteína TcPIWI-tryp en la célula huésped, lo que estaría indicando su incorporación mediada por microvesículas en un mecanismo similar al de los pequeños ARNs. Pero estaba la posibilidad de que la detección de TcPIWI-tryp en la célula receptora podría ser consecuencia de su

incorporación como proteína o de la posible incorporación del ARNm de TcPIWI-tryp y de su posterior traducción a proteína por la célula huésped. Para determinar que estaba ocurriendo realmente pre-tratamos las células receptoras con cicloheximida, la cual inhibe la síntesis de proteínas y observamos que la señal fluorescente para TcPIWI-tryp seguía apareciendo en las células huésped (**Figura 35 B** panel inferior). A su vez, demostramos la ausencia del ARNm de TcPIWI-tryp en las células receptoras mediante FISH (**Figura 35 C**). Todo esto valida la hipótesis de que es efectivamente la proteína TcPIWI-tryp la que está siendo transferida a la célula huésped a través de microvesículas secretadas por *T. cruzi*.

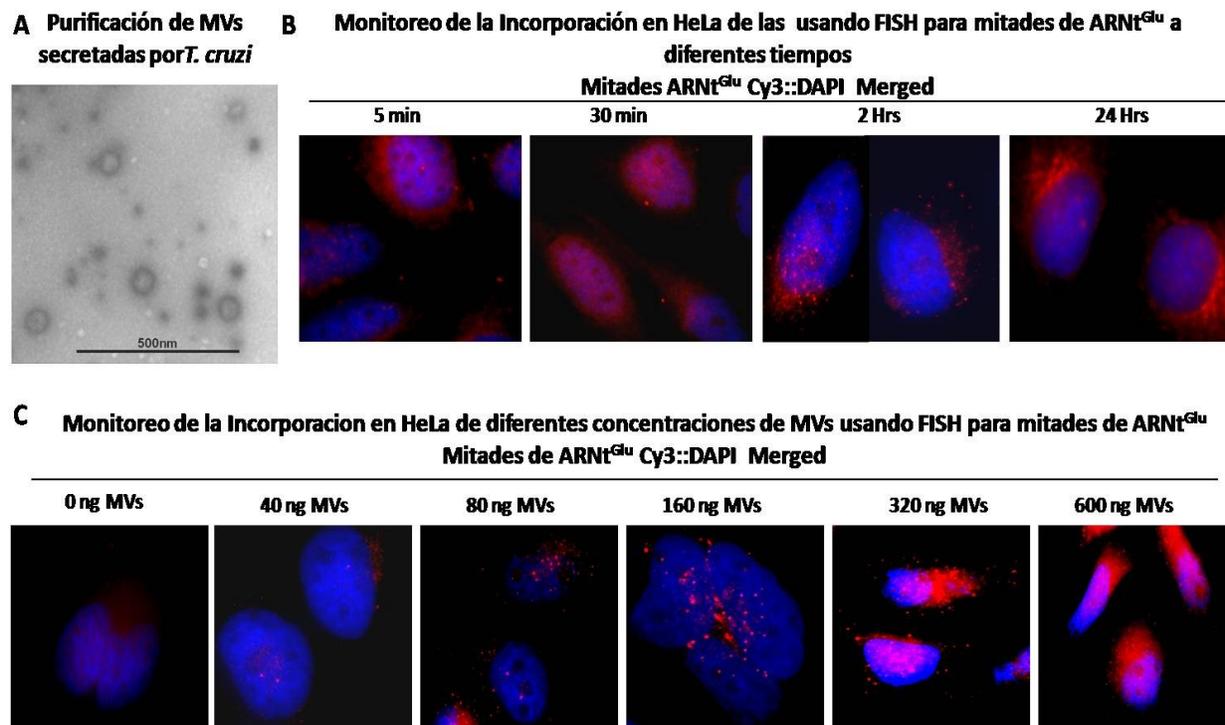


**Figura 35: TcPIWI-tryp contenida en las microvesículas secretadas por *T. cruzi* es transferida a sus células huésped. (A).** Control para descartar la incorporación de sonda libre por la célula huésped en las condiciones estudiadas. **(B).** Panel superior: Visualización de la sonda fluorescente de mitades 5' de ARNt<sup>Asp</sup> como control de transferencia de material, acoplada a la detección de TcPIWI-tryp por inmunofluorescencia. Panel Inferior: mismo experimento pero con células pre-tratadas con cicloheximida donde se sigue observando la presencia de TcPIWI-tryp. **(C).** Ensayo de FISH para la detección del ARNm de TcPIWI-tryp en la célula huésped, donde no se observa señal para la misma.

### 3.11 La Incorporación del contenido de microvesículas secretadas por *T. cruzi* en células HeLa modifica su expresión génica.

Anteriormente en nuestro trabajo, y trabajos de otros autores también han demostrado, que la incorporación del contenido de las microvesículas por otros parásitos por ejemplo, lleva al desencadenamiento de transiciones en el ciclo de vida; y por sus células huésped a un incremento en la susceptibilidad a la infección por el parásito (Deolindo et al. 2013; Inal et al. 2013). Estas evidencias, junto con resultados que mostraremos posteriormente en esta tesis con células no susceptibles a la infección por *T. cruzi*, proveen soporte a la posible noción de que las microvesículas secretadas por *T. cruzi* podrían estar preparando a su célula huésped para su futura invasión. Por todo esto, nos propusimos estudiar el efecto a nivel de la expresión génica que podría tener la incorporación de las microvesículas de *T. cruzi* y de algunos elementos específicos como los fragmentos derivados de ARNt Thr y Leu presentes en su contenido, en su célula huésped.

Para llevar a cabo este objetivo, comenzamos con la optimización de las condiciones de trabajo. Como primera aproximación verificamos la muestra obtenida de microvesículas del protocolo de centrifugación diferencial y ultracentrifugación por microscopía electrónica de transmisión (**Figura 36 A**). Donde se observa que estamos trabajando con una fracción pura y heterogénea de microvesículas secretadas por *T. cruzi*. A continuación, probamos diferentes tiempos de incubación de las microvesículas con su célula huésped (5, 30 minutos, 2 y 24 horas) siguiendo la incorporación del contenido por FISH para mitades 5' ARNt<sup>Glu</sup>. Decidimos que el tiempo óptimo de incorporación eran 2 horas (**Figura 36 B**). Posteriormente, intentamos determinar la mejor relación microvesículas/célula huésped, por lo que incubamos el mismo número de células HeLa con concentraciones crecientes de microvesículas (desde 0 a 600ng). Determinamos que el tratamiento con 160ng de microvesículas por 2 horas es suficiente para la incorporación del contenido de las mismas por células HeLa (**Figura 36 C**).



**Figura 36. Optimización de las condiciones de trabajo para la incorporación de microvesículas secretadas por *T. cruzi* por células HeLa. (A).** Se muestran micrografías de microscopía electrónica de transmisión representativas para verificar el material obtenido en el protocolo de purificación de microvesículas. **(B).** FISH para mitades 5' ARNt<sup>Glu</sup> para el monitoreo de la incorporación a diferentes tiempos de las microvesículas por las células HeLa. **(C).** FISH para mitades 5' del ARNt<sup>Glu</sup> monitoreando la incorporación de diferentes concentraciones de microvesículas por células HeLa.

Una vez puestas a punto las condiciones óptimas de trabajo procedimos con el análisis de los posibles cambios transcriptómicos en las células HeLa que incorporaron el contenido de microvesículas secretadas por *T. cruzi*. El perfil de expresión de las células HeLa tratadas se analizó usando la plataforma de microarreglos de Agilent, para tres puntos temporales diferentes (6, 24 y 72 horas) luego de la interacción con las microvesículas. Luego del análisis estadístico, se observó que 5580 genes se expresaron diferencialmente en al menos uno de los tres puntos analizados con respecto al control ( $p\text{-value} \leq 0.05$ ). De estos, 743 presentaron un cambio en sus niveles de expresión  $\geq 3$  y 605 genes mostraron un cambio de  $\geq 3$  a las 6 hrs de la incorporación de microvesículas. Este número se reduce con el tiempo, siendo 351 y 49 a las 24 y 72 hrs (**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Tabla mostrando el número de genes diferencialmente expresados en los diferentes tiempos estudiados comparado con el control de células sin tratar con microvesículas.

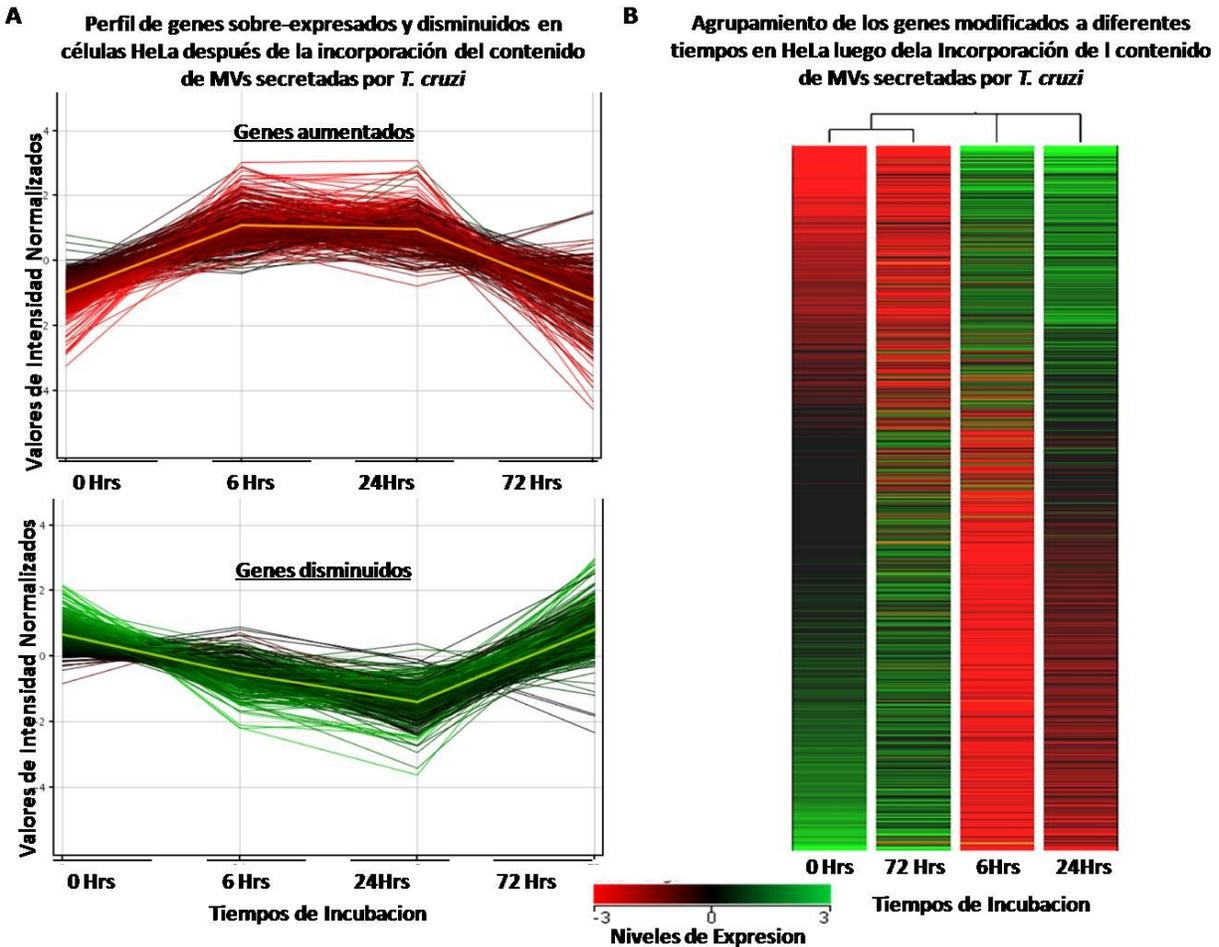
**Numero de Genes expresados diferencialmente luego de la Incorporación de MVs de *T. cruzi* en los diferentes tiempos comparando con Control (0Hrs)**

Tiempos	Total	Total (FC $\geq$ 3)	6Hrs (FC $\geq$ 3)	24 Hrs (FC $\geq$ 3)	72Hrs (FC $\geq$ 3)
<b>Numero de Genes modificados</b>	<b>5580</b>	<b>743</b>	<b>605</b>	<b>351</b>	<b>49</b>

Un perfil detallado de la tendencia de cambios en la expresión génica de las células HeLa en el tiempo puede verse en la **Figura 37 A**. Se muestran dos grupos de genes, los aumentados y los disminuidos por separado. De estos se desprende que la mayor porción de cambios ocurre a las 6 y 24 horas después de la incubación, mientras que a las 72 horas post-tratamiento la mayoría de los ARNm celulares estudiados vuelven a su estado normal, del control. Un análisis por agrupamiento da soporte a esta tendencia. En la **Figura 37 B** se puede apreciar cómo se agrupan el control y los genes a las 72 horas por un lado, y las muestras para 6 y 24 horas por otro.

Estos resultados parecen indicar que las microvesículas secretadas por *T. cruzi* desencadenan cambios importantes en la expresión génica de su huésped, los cuales son más pronunciados en tiempos cortos después de la interacción, y que retornan a la normalidad luego de las 24 horas. Esto podría estar relacionado con los fenómenos necesarios para la entrada del parásito a la célula y no tanto con el mantenimiento de la infección, por ejemplo.

Un análisis de las vías celulares en las cuales intervienen estos genes modificados reveló que las microvesículas secretadas por *T. cruzi* inducen un amplio cambio en la remodelación del citoesqueleto del huésped, en la matriz extracelular y en la respuesta inmune del mismo. Algunas de estas vías son de particular interés por su relevancia en la interacción huésped-parásito. La concreción de más experimentos en el futuro serán necesarios para validar la relevancia de cada gen implicado en esta interacción y que modifica su expresión como respuesta a las señales liberadas en las microvesículas de secreción de *T. cruzi*.



**Figura 37:** Perfil de los cambios en el transcriptoma de células HeLa luego de la incorporación de microvesículas secretadas por *T. cruzi*. **(A).** Panel Superior: Perfil de los genes que aumentaron su expresión luego de la incorporación de microvesículas secretadas por *T. cruzi* en el tiempo. Panel Inferior: Perfil de los genes que disminuyeron su expresión luego de la incorporación de microvesículas secretadas por *T. cruzi* en el tiempo. **(B).** Análisis de agrupamiento de los genes en células HeLa que modificaron su expresión luego de la incorporación de microvesículas secretadas por *T. cruzi* en el tiempo. El rango de colores indica los niveles de expresión, desde rojo para genes disminuidos hasta verde para aumentados; con un cambio mayor o igual a tres veces.

Dado que recientemente reportamos que las microvesículas de *T. cruzi* transportaban gran cantidad de fragmentos derivados de ARNt, entre otros elementos; decidimos revelar cuánto del cambio observado se debía a dos de los principales fragmentos de ARNt hallados en las microvesículas (derivados de Thr y Leu). Para evaluar su efecto potencial en las células huésped, se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) células HeLa con ribo-sondas sintéticas resistentes marcadas con fluorescencia para las mitades de ARNt<sup>Thr</sup>, ARNt<sup>Leu</sup> y sus correspondientes sondas controles “*shuffled*”, que presentan la misma composición nucleotídica, pero con diferente secuencia. Se realizaron ensayos de microarreglos para el ARN purificado a

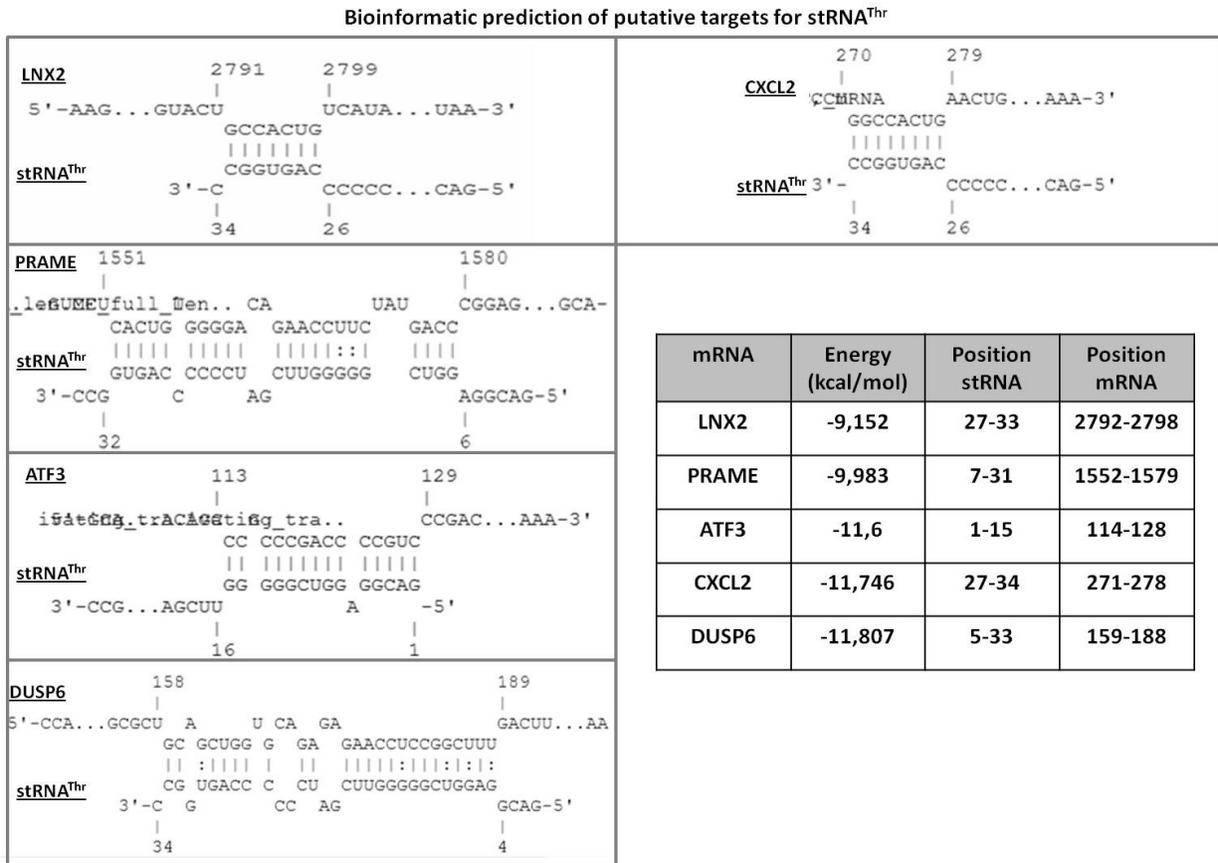
las 24 horas luego de la transfección. El análisis de estos microarreglos reveló que las mitades de ARNt<sup>Leu</sup> no modifican significativamente la expresión génica de las células HeLa. Sin embargo, las mitades de ARNt<sup>Thr</sup> modifican significativamente 12 genes con un p-valor  $\leq 0.01$ , y un cambio en el nivel de expresión  $\geq 2$ ). Al comparar este resultado con la lista de genes modificados a las 24 horas post-incorporación del contenido total de microvesículas, determinamos que 5 (ATF3, LNX2, PRAME, CXCL2 y DUSP6) de los 12 genes modificados por las mitades de ARNt<sup>Thr</sup> se encuentran también modificados por las microvesículas (**Tabla 5**).

**Tabla 5:** Lista de Genes modificados en células HeLa luego de 24 horas de la incorporación del contenido de microvesículas secretadas por *T. cruzi*. En gris se muestran los genes que también se modificaron luego de 24 horas de la incorporación de mitades de ARNt<sup>Thr</sup>.

Gen	Nombre	Nivel de cambio (C vs stRNA-Thr)	Nivel de Cambio (C vs MVs)
SURF4	Surfeit 4	2,1	-
MGC16075	Hypothetical protein MGC16075	2,2	-
COTL1	Coactosin-like 1 (Dictyostelium)	2,3	-
NCOR1	Nuclear receptor co-repressor 1	2,3	-
LNX2	Ligand of numb-protein X 2	2,3	1,5
PRAME	Preferentially expressed antigen in melanoma	2,3	2,0
ATF3	Activating transcription factor 3	3,3	1,2
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	3,4	-
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	3,5	-
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	3,7	3,2
DUSP6	Dual specificity phosphatase 6	4,1	3,0
EGR2	Early growth response 2	4,2	-

En el capítulo de discusión haremos una breve reseña de las características de estos genes y de su posible relevancia en la interacción huésped-parasito, que es a lo que apuntan determinar nuestros ensayos.

A continuación realizamos análisis bioinformáticos para la determinación de posibles regiones “semilla” de apareamiento de las mitades de ARNt<sup>Thr</sup> en los ARNm hallados modificados en las células HeLa receptoras (ATF3, LNX2, PRAME, CXCL2 y DUSP6). El análisis reveló que dichos genes poseen regiones factibles de ser blanco para el sARN estudiado (Figura 38). Estos análisis necesitan validación *in vitro*, principalmente con genes reporteros, pero podrían estar indicando que estos genes son blancos directos para las mitades de ARNt<sup>Thr</sup>.



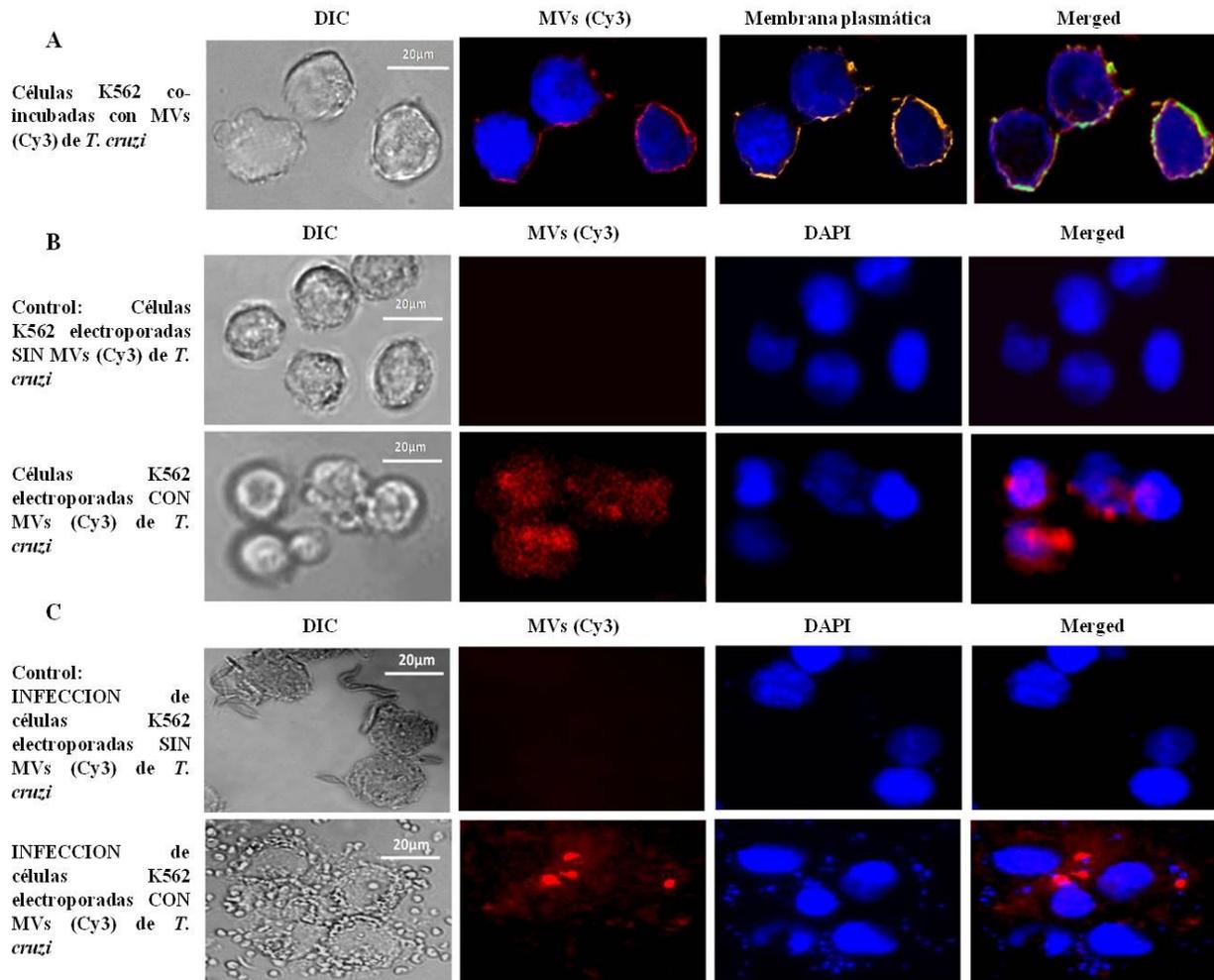
**Figura 38. Predicción Bioinformática de sitios blancos posibles para las mitades de ARNt<sup>Thr</sup> en los ARNm estudiados.** Se utilizó la herramienta en línea IntaRNA v 1.2.5: <http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/v1/IntaRNA.jsp>, se predijeron las interacciones posibles entre 2 moléculas, sARN Thr y los ARNm ( ATF3, LNX2, PRAME, CXCL2 y DUSP6); que se habían encontrado modificados luego de la incorporación de microvesículas de *T. cruzi* así como también luego de la sobre-expresión del citado sARN en células HeLa. Las figuras muestran los lugares de apareamiento y la tabla, las características de los mismos.

### 3.12 La incorporación del contenido de las microvesículas en células no-susceptibles confiere susceptibilidad a la infección.

Con el objetivo de conocer el posible rol biológico de la transferencia de material genético y proteínas desde el parásito a través de microvesículas a células de mamífero, realizamos una serie de ensayos usando como modelo células K562 (línea celular de Eritroleucemia derivada de un paciente con Leucemia Mieloide Crónica en una crisis blástica), que se conoce es resistente a la infección por *T. cruzi* (Ruiz et al. 1998; Magdesian et al. 2001). A diferencia de lo que ocurre con células susceptibles, las células K562 co-cultivadas en presencia de microvesículas marcadas secretadas por *T. cruzi* no incorporan espontáneamente el contenido de dichas microvesículas. Como se observa en la **Figura 39 A**, cuando se realizan estos ensayos las microvesículas permanecen adheridas a la membrana plasmática, marcada con Cell Mask.

Estos resultados nos llevaron a especular con la posibilidad de que tal vez la fusión de las microvesículas del parásito y la liberación de su contenido en la célula huésped sea un evento necesario para llevar a cabo una futura infección productiva por *T. cruzi*. Por lo que a continuación seguimos con una serie de ensayos donde se evaluaría la susceptibilidad a la infección en células resistente tratadas mediante electrofusión del contenido de microvesículas y células no tratadas. Para esto usamos como control células K562 electroporadas solo con medio, y células k562 electroporadas con el contenido de microvesículas marcadas y observamos la incorporación de señal en las mismas. Luego de 24 Hrs de la electroporación como era esperable, solo las electroporadas con microvesículas marcadas mostraban señal de incorporación del material contenido en dichas microvesículas (**Figura 39 B**).

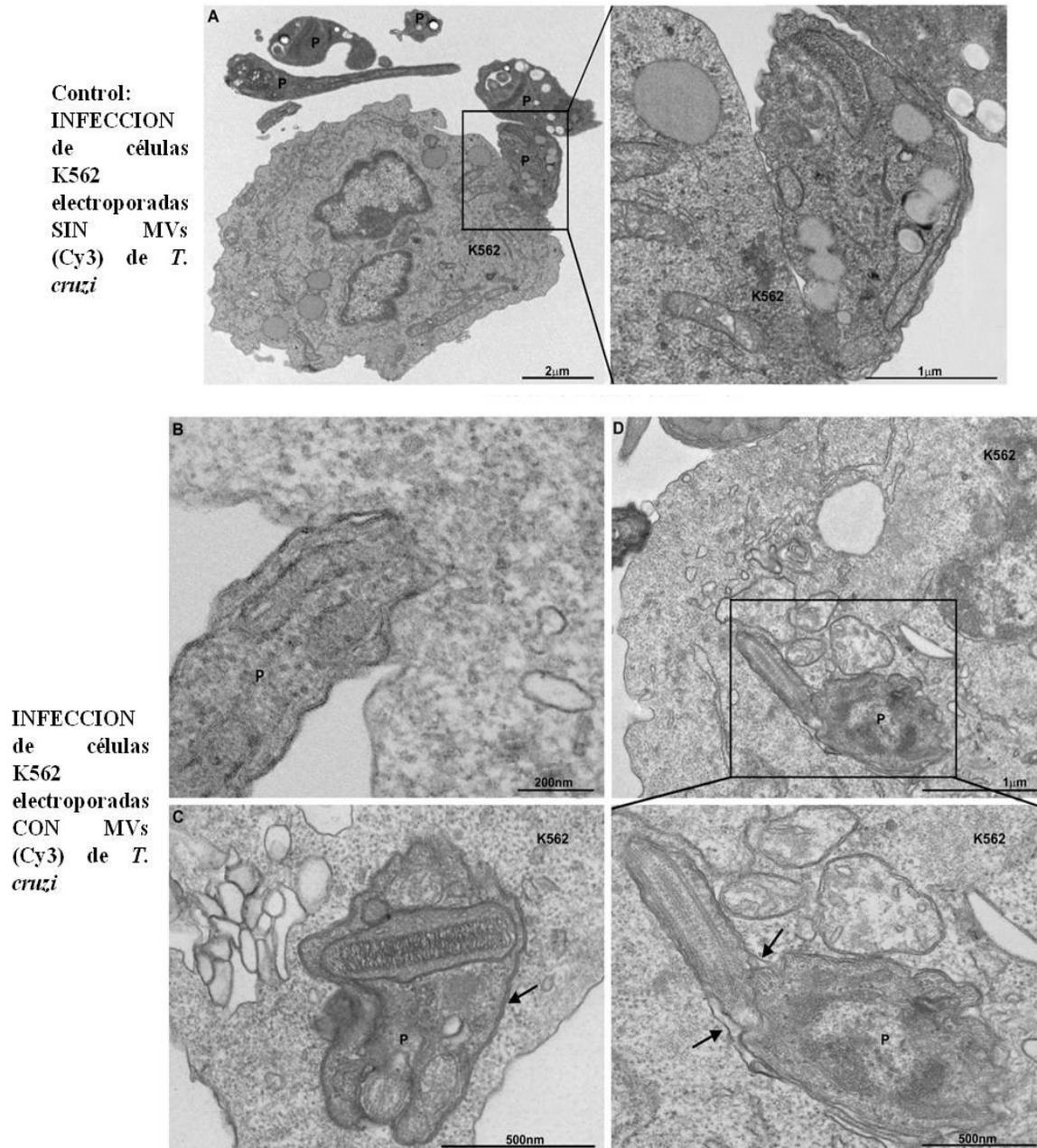
Posteriormente entonces, desafiamos a la infección por *T. cruzi* a ambas poblaciones celulares de K562. Cuando se realizó la incubación con parásitos metacíclicos, únicamente la población transformada con el contenido de microvesículas de *T. cruzi* mostró características de haber sido efectivamente infectadas. Observándose en el medio de cultivo y adheridas a las células formas que parecen ser amastigotes (**Figura 39 C**). Cabe destacar en este punto, que las células K562 son células en suspensión con muy poco citoplasma, por lo tanto es difícil realizar por un lado los ensayos de infección, porque no es fácil de lavar post-infección los parásitos remanentes que no entraron a la célula, y por otro lado, por el tamaño citoplasmático no es fácil que se sustente una infección muy grande, por lo que sospechamos que lo que estamos observando es la ruptura abrupta de las células infectadas y la liberación temprana de formas replicativas al medio.



**Figura 39. Evaluando por Microscopia de Epifluorescencia cambios en la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* de células K562 tratadas y sin tratar con microvesículas. (A).** Co-cultivo de microvesículas marcadas con sonda para mitades de ARNt Asp-Cy3 y células K562 por 24 Hrs y posterior tinción de membrana plasmática con CellMask Orange™ (Invitrogen). **(B)** Experimentos controles mostrando en el panel superior la ausencia de señal de incorporación de sonda marcada por K562 y en el panel inferior, la efectiva incorporación del contenido de microvesículas por su electroporación en dichas células. **(C).** Infección por *T. cruzi* de las células tratadas y no tratadas con microvesículas luego de 3 días de infección.

Para poder superar las dificultades anteriormente mencionadas de trabajar con este tipo de células, decidimos realizar ensayos de Microscopía Electrónica de Transmisión para verificar lo que estábamos observando por Microscopía de Fluorescencia. Para ello usamos las mismas células tratadas y no tratadas, y las desafiamos por 12 horas a su infección por *T. cruzi*, fijamos el material y procedimos al preparado de las muestras para su observación. Los resultados de estos ensayos revelaron que aunque las células K562 controles sin tratar eran capaces de interaccionar con los parásitos, los mismos permanecen adheridos a su superficie, y no son capaces de penetrar al citoplasma y comenzar la infección (**Figura 40 A**).

En cambio, cuando la interacción de los parásitos es con las células que han incorporado artificialmente el contenido de las microvesículas de *T. cruzi*, los parásitos son capaces de adherirse a la célula huésped y de penetrar a la misma. Por lo que efectivamente se observan formas parasitarias en el citoplasma celular (**Figura 40 B-D**). Por medio de estos resultados pudimos comprobar que efectivamente *T. cruzi* es capaz de invadir células K562 cuando las mismas han incorporado previamente el contenido de microvesículas secretadas por estos parásitos. Por lo que nuestros ensayos sugieren que la fusión de microvesículas liberadas por *T. cruzi* podría ser un paso relevante y necesario en el proceso de infección parasitaria.



**Figura 40: Monitoreo de la infección por *T. cruzi* de células K562 tratadas y control. (A).** Se muestran micrografías representativas de células K562 control interaccionando con *T. cruzi*. **(B-D).** Células K562 tratadas con microvesículas e infectadas por *T. cruzi* donde se observan formas parasitarias entrando y dentro de la célula huésped, con flechas se marca lo que asemeja la membrana de la vacuola parasitófora en una ampliación de la imagen C.

## 4. Discusión

### 4.1 Impacto esperado de los resultados y perspectivas.

#### Abreviaturas.

Uno de los hitos más relevantes de los últimos años de la biología molecular es el surgimiento de los pequeños ARNs reguladores no codificantes como elementos claves en la regulación génica. A su vez, también se ha demostrado que la familia de enzimas RNAsas tipo III y de proteínas del tipo Argonauta-Piwi son esenciales para la biogénesis y el cumplimiento de las funciones efectoras de estos sARNs. Además, la distribución taxonómica de la maquinaria asociada a los sARNs en todos los supergrupos eucariotas estudiados (Cerutti and Casas-Mollano 2006; Hutvagner and Simard 2008) así como la demostración directa del fenómeno de ARNi en la mayoría de estos organismos, sugiere que estos componentes se encontraban presentes en el ancestro común a todos los eucariotas. Sin embargo, como hemos mencionado en la introducción ciertos organismos unicelulares como *S. cerevisiae* y algunos protozoarios parásitos tales como *T. cruzi* y *L. major* parecen haber perdido independientemente sus genes para proteínas de la familia Argonauta junto con la maquinaria entera para ARNi. Esto nos ha llevado a la intrigante pregunta sobre la indispensabilidad o no de las vías mediadas por sARNs en el ciclo de vida de ciertos organismos.

Previamente en mi tesis de Maestría, especulando sobre la posible existencia de vías regulatorias mediadas por sARNs alternativas a las canónicas ya conocidas, se comenzó por un lado estudiando el único miembro de la familia de las proteínas Argonautas presente en el genoma de *T. cruzi*. Mostramos que TcPWI-tryp se expresaba en todo el ciclo de vida del parásito citoplasmáticamente y que podría presentar un dominio PAZ divergente no reportado hasta entonces (Garcia Silva et al. 2010). Por otro lado, construimos y analizamos una librería de ADNc de epimastigotes de *T. cruzi* donde revelamos la presencia de una población homogénea

de sARNs representada por mitades derivadas de una clase restringida a ciertos isoaceptores de ARNt con ~30 nts de longitud, la cual era más abundante en situaciones de estrés nutricional. A su vez ensayos sobre localización celular mediante FISH de estas mitades de ARNt mostraron que las mismas se reclutaban en estructuras granulares citoplasmáticas particulares específicas que no se correspondían en su totalidad con los organelos característicos ya descritos para *T. cruzi* (Garcia-Silva et al. 2010).

Como hemos mencionado en la introducción, en la pasada década, además de las clases de sARNs no codificantes canónicas muchos trabajos recientes también han revelado la ocurrencia de estos fragmentos derivados de ARNt los cuales parecen ser específicamente procesados y mantenidos en plantas, hongos y animales, y no parecen ser productos de degradación al azar de los ARNt maduros (Huttenhofer et al. 2001; Yuan et al. 2003; Jochl et al. 2008; Kawaji et al. 2008; Li et al. 2008; Thompson et al. 2008). Como se informó, el clivaje de ARNt apareció como una vía altamente conservada de procariontas a eucariotas superiores, a menudo desencadenada por estrés nutricional, biológico o físico (Lee and Collins 2005; Haiser et al. 2008; Jochl et al. 2008; Kawaji et al. 2008; Li et al. 2008; Zhang et al. 2009). A pesar de que su relevancia biológica no ha sido completamente elucidada, evidencia experimental reciente sugiere que pequeños ARNs derivados de ARNt emergieron como una vía evolutivamente conservada con un papel putativo en la regulación de la expresión génica bajo ciertas presiones de supervivencia (Elbarbary et al. 2009; Haussecker et al. 2010). Estos productos de ARNt inducidos por estrés pueden ser de 30-40 nt de longitud (tsRNAs) y más cortos de ~ 20-30 nt de longitud y derivan de las mitades 5' o 3' del ARNt maduro (tRFs) (Lee et al. 2009).

Sin embargo, la función y significado biológico de estos fragmentos derivados de ARNt permanece sin ser elucidada. Recientemente en una revisión recopilamos los resultados que hasta hoy se han encontrado que apoyan la idea del potencial rol en el silenciamiento génico de ciertos genes y de la importancia biológica de estos fragmentos derivados de ARNt en enfermedades infecciosas, especialmente como biomarcadores y posibles nuevos elementos terapéuticos, ver **Material Suplementario 5:** (Garcia-Silva et al. 2012; Garcia-Silva et al. 2013).

Por esto, nos propusimos como primer objetivo en colaboración con el ICC de Curitiba realizar una búsqueda mediante clonado de estos fragmentos derivados de ARNt en el estadio infectivo de *T. cruzi*. Como describimos en resultados, la población de sARNs en metacíclicos está constituida principalmente por fragmentos derivados de ARNt (63.1%), en una proporción significativamente mayor que la reportada anteriormente por nuestro grupo para epimastigotes (25%) (Garcia-Silva et al. 2010). Esta alta frecuencia es sorprendente, pero en cierta medida esperada, como se ha mencionado la escisión de ARNt es un proceso conservado en las células bajo diferentes tipos de estrés, no simplemente para inducir la degradación de ARNt, sino para generar nuevas especies de ARN que jueguen una función biológica única (Li et al. 2008; Thompson et al. 2008; Lee et al. 2009; Pederson 2010). Las formas tripomastigotes metacíclicos son el producto de la diferenciación de epimastigotes promovidos por un estímulo de estrés, a

través de un proceso llamado metacicloogénesis (Ferreira et al. 2008). La metacicloogénesis se inicia mediante la exposición y el mantenimiento de los epimastigotes al estrés (principalmente nutricional) y es fundamental para generar la fase infecciosa del parásito, en la cual se silencia la expresión de varios genes, los parásitos en esta fase no son capaces de proliferar pero si de sobrevivir a los cambios ambientales extremos como cuando son transmitidos desde las heces de insectos a los mamíferos.

Sorprendentemente, no sólo los fragmentos derivados de ARNt aparecen enriquecidos en metacíclicos, su composición y estructura fueron completamente alteradas. Mientras que más de 90% de todos los fragmentos secuenciados de ARNt en epimastigotes derivan de Glu (CUC/UUC) y de Asp (GUC), los fragmentos de ARNt con mayor frecuencia clonados a partir de metacíclicos derivan de Glu (UUC: 34 %), Thr (AGU: ~ 15 %), y Val (CAC:~ 13 %). Este porcentaje de la mayoría de los fragmentos clonados en este estudio no se corresponde con el número de copia de estos genes de ARNt ni con el uso de codones, según el estudio de Horn *et al* (Horn 2008). Aunque no sabemos el significado de estos cambios, los fragmentos derivados de ARNt<sup>Glu</sup> también son predominantes en los seres humanos y se han relacionado a la regulación de un ARNm específico (Elbarbary et al. 2009).

En cuanto a la especificidad del clivado, en contraste con las mitades 5' de ARNt identificadas en epimastigotes antes, la escisión en metacíclicos se produjo predominantemente en el bucle anticodón hacia el T - C del brazo del ARNt, generando fragmentos de ~ 33 nt de mitades 3' de ARNt. El estrés ambiental o nutricional necesario para el proceso de metacicloogénesis podría haber activado endonucleasas específicas, responsables de la biogénesis de mitades 3' en lugar de los fragmentos 5' producidos en epimastigotes. Por lo tanto, se podría inferir que los fragmentos de ARNt se acumulan debido a la tensión ambiental asociada a una reducción en la tasa metabólica de los epimastigotes. La presencia en los fragmentos 3' de extremos CCA en casi el 35 % de los fragmentos es significativa, esto sugiere que los ARNt que se han procesado ya estaban maduros, lo que resulta en fragmentos resistentes a la digestión por exonucleasas debido a sus extremos 3' protegidos (Deutscher 2006). En mamíferos, se ha propuesto la existencia de dos clases de fragmentos derivados de ARNt, el tipo I dependientes del procesado por Dicer, que se incorporan en proteínas Argonautas, tienen capacidad de silenciamiento y están esencialmente restringidos al citoplasma. Por otro lado, fragmentos derivados de ARNt de tipo II, se generan por RNaseZ y por la RNA polimerasa III dejando un tramo de uracilos en el extremo 3' (Elbarbary et al. 2009). Por lo tanto, los datos presentados aquí nos permiten confirmar que en *T. cruzi* se producen al menos uno de estos dos tipos de fragmentos derivados de ARNt.

Ensayos de FISH tanto para mitades 3' como 5' de ARNt, nos permitieron definir que estos fragmentos se encuentran dispersos por todo el citoplasma de metacíclicos, en estructuras no muy definidas. En contraste con la localización granular y posterior bien particular de las mitades de ARNt en epimastigotes, los cuales parecían presentar una co-localización parcial con

reservosomas (Garcia-Silva et al. 2010). Estos nuevos resultados demuestran que las mitades de ARNt pueden cambiar drásticamente su localización durante la metacicloogénesis. Este cambio podría tener relación con la ausencia de reservosomas que se ha observado en las forma metacíclicas (Figueiredo et al. 2004). Tal cambio sugiere posibles diferentes funciones para estas moléculas en las distintas etapas del parásito. Esta distribución se asemeja con la localización citoplasma para el tipo II de fragmentos derivados de ARNt descritos anteriormente.

En el trabajo que publicamos en Reifur *et al* (Reifur et al. 2012), se excluye la posible participación de estas moléculas en la maquinaria de traducción activa, ya que no se detectaron asociadas a polisomas o ribosomas. En conclusión de estos resultados, se logró caracterizar la composición de la población de pequeños ARNs en metacíclicos de *T. cruzi*. Se observó un cambio importante en la cantidad de fragmentos derivados de ARNt, pasando de 26% en epimastigotes al 62,6% de todos los sARNs en metacíclicos. Curiosamente, las mitades de 5' de ARNt que se encuentran en epimastigotes no se encuentran en metacíclicos, en su mayoría se procesan derivados de la mitad 3'. Los mecanismos o moléculas que favorecen la escisión específica de estos ARNt son desconocidos, sin embargo, es probable que esta vía sea inducida por el estrés nutricional necesario para la diferenciación del parásito. Nada se conoce acerca de su función en tripanosomátidos excepto que cambian su localización cuando la célula está bajo tensión durante el proceso de diferenciación para generar la forma infecciosa. Dado que en *T. cruzi* existen varios mecanismos alternativos para el control post-transcripcional de la expresión génica, es probable que tal vez los fragmentos derivados de ARNt estén disponibles con el propósito de ser usados en el control de la misma. Los resultados presentados en la correspondiente sección de la presente tesis son parte de una publicación de 2012 ver: (Reifur et al. 2012).

A continuación, nos planteamos que una comprensión más completa de los sARNs unidos a proteínas del tipo Argonauta en estos organismos deficientes de las vías de ARNi, posiblemente podría proporcionar algunos conocimientos sobre los mecanismos de regulación de la expresión génica independientes de ARNi. En principio la sobre-expresión de TcPIWI-tryp no reveló cambios fenotípicos cuantificables en los parásitos sobre-expresantes. Con respecto a este punto se intentaron realizar ensayos de *knock out* del gen pero no se lograron. En el futuro se pondrán más esfuerzos en continuar con esta estrategia. Por otro lado, el análisis de estos sARNs podría revelar un papel funcional de estos potenciales reguladores, que a su vez podría arrojar luz sobre la biología de este parásito, sobre su complejo ciclo de vida y su patogénesis. El secuenciado de sARNs co-inmunoprecipitados con TcPIWI-tryp, reveló una distribución de longitud de sARNs similar a la encontrada en *Drosophila*, donde se ha descrito que la población principal de sARNs unidos a PIWI es de 26 nts de largo. No obstante, esta biblioteca fue realizada para secuencias de 22 a 29 nts, por lo que no pudimos comparar directamente la segunda población más grande de 30 nts halladas en TcPIWI-tryp (Brennecke et al. 2007). Sin embargo, nuestros resultados también son comparables con los reportados por Couvillion *et al*

(Couvillion et al. 2010), donde PIWI Twi12 en *Tetrahymena* une predominantemente dos poblaciones de sARNs una de 23 nts y otra de 30 nts.

Mientras se preparaba esta tesis, varios estudios aparecieron disponibles en relación con sARNs unidos a proteínas Argonauta en *Drosophila*, *Tetrahymena*, humanos, ratón, *Schistosoma japonicum*, y plantas (Brennecke et al. 2007; Couvillion et al. 2010; Burroughs et al. 2011; Cai et al. 2012; Couvillion et al. 2012; Loss-Morais et al. 2013; Wei et al. 2013) . Nuestros datos difieren de los reportados para las proteínas Argonauta en *Drosophila*, *Tetrahymena*, humanos, ratón, y plantas, debido principalmente a la ausencia de sARNs canónicos en *T. cruzi*, como hemos señalado anteriormente. Nuestros resultados indican que TcPIWI-tryp lleva un repertorio diferente de sARNs en comparación con proteínas Argonautas canónica de eucariotas superiores. Estos resultados podían llevarnos a considerar la posible existencia de vías diferentes o antiguas de sARNs en organismos ARNi-negativos. En este contexto, se puede especular que los organismos con genomas reducidos podrían emplear moléculas pre-existentes como precursores para generar sARNs con funciones potencialmente reguladoras, que no están bien dilucidados en la actualidad. Estos resultados forman parte de una comunicación corta enviada a Gene en 2013 (Garcia-Silva et al, 2013).

Paralelamente a esto nos propusimos caracterizar las estructuras granulares citoplasmáticas en las cuales se reclutan activamente estos fragmentos derivados de ARNt y reportados en (Garcia-Silva et al. 2010), lo cual nos podría sugerir los tipos de procesos biológicos en los cuales están involucradas estas moléculas. Ensayos de co-localización por microscopía confocal revelaron que una proporción significativa de las mitades de ARNt co-localiza con Clatrina, lo que sugiere que podrían estar asociadas a vesículas intracelulares o compartimentos membranosos. Clatrina es una proteína de andamiaje encontrada en diferentes tipos de vesículas en la mayoría de las células eucariotas. La misma juega un papel importante en la membrana plasmática en la endocitosis mediada por receptor cuando se asocia con diferentes moléculas adaptadoras (Ungewickell and Hinrichsen 2007).

A este respecto, la presencia de un sistema de invaginaciones de vesículas membranosas mediada por Clatrina se demostró recientemente en *T. cruzi*, el cual se ha visto juega un papel fundamental en las vías endocítica y exocítica (Correa et al. 2007). Las vesículas revestidas de Clatrina también pueden formarse a partir de otros compartimentos membranosos tales como membranas de origen endosomal (Raiborg et al. 2001), la red trans-Golgi (Deborde et al. 2008) y vesículas de la membrana plasmática (Keyel et al. 2004). Sin embargo, ya que la generación de vesículas mediada por Clatrina es un proceso transitorio donde la misma se desensambla rápidamente permitiendo reciclarse, no podemos excluir que su co-localización con las mitades de ARNt y TcPIWI-tryp pueda ser la consecuencia de un reclutamiento no específico en organelos de almacenamiento como los reservosomas (Soares 1999).

Para esto, un análisis más detallado por microscopía electrónica de transmisión hibridación *in situ* con oro-Estreptavidina y la tinción inmunoespecífica para TcPIWI-tryp

mostró que las mitades de ARNt y TcPIWI-tryp se incluyen en varios organelos delimitados por membranas, principalmente reservosomas, estructuras vesiculares que se asemejan a membranas del Golgi y otras vesículas intracelulares distribuidas a lo largo el cuerpo de la célula. En conjunto, estos datos sugieren que la biogénesis de estos fragmentos de ARNt podría ser parte de rutas endocíticas / exocíticas en *T. cruzi*. Los protozoos de la familia Trypanosomatidae tienen una actividad endocítica muy polarizada que se produce exclusivamente en el bolsillo flagelar y las regiones del citostoma (de Souza et al. 2009). El citostoma es una estructura especializada formada por la invaginación de una región bien definida de la superficie del protozoo situado en la región anterior y cerca de la bolsa flagelar. Las vesículas formadas en el bolsillo flagelar o el citostoma son parte de una red endocítica vesicular-tubular ramificada que compone los endosomas temprano. Las vesículas cargadas por esta ruta proporcionan nutrientes a los organelos de almacenamiento de *T. cruzi*, los reservosomas (de Souza et al. 1978; Porto-Carreiro et al. 2000; Cunha-e-Silva et al. 2006).

Los reservosomas son grandes compartimentos presentes en la región post-nuclear de las formas epimastigotes de parásitos que pertenecen al género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, descritos inicialmente como cuerpos multivesiculares (de Souza et al. 1978). Deben su nombre a que almacenan macromoléculas ingeridas por el parásito a través de procesos de endocitosis (Soares 1999) y han sido reportados como compartimentos endosomales tardíos en epimastigotes de *T. cruzi* (Cunha-e-Silva et al. 2006). Además, estudios sobre la biogénesis de los reservosomas revelaron que vesículas originadas a partir del complejo de Golgi pueden fusionarse con los mismos formando parte de la vía endocítica. En efecto, Cruzipaína, una proteasa importante sintetizada por *T. cruzi*, se desprende de las cisternas del Golgi y se recluta principalmente en los reservosomas (Souto-Padron et al. 1990). El hecho de que proteínas como Cruzipaína así como los sARNs se observen simultáneamente en reservosomas que desprenden vesículas sugiere fuertemente la idea de que los mismos podrían ser organelos con funciones exocíticas (Aparicio et al. 2004). Hoy en día se acepta que los reservosomas no constituyen una población uniforme, de hecho, podría haber diferentes reservosomas por ejemplo de almacenamiento, reciclaje o con las funciones típicas de lisosoma (Cunha-e-Silva et al. 2006).

Tomado en cuenta estas evidencias experimentales nos planteamos la hipótesis de que la acumulación de la proteína TcPIWI-tryp y de fragmentos derivados de ARNt en reservosomas podría ser resultado de dos vías diferentes: una que representa la contribución de las microvesículas a través de su captación de vías endocítica (origen exógeno) y otra que representan la contribución de las microvesículas de la red trans-Golgi de la propia célula (origen endógeno). Las vías endocítica /exocítica implicadas en la captación de microvesículas secretadas por *T. cruzi* son actualmente desconocidas. La evidencia experimental presentada aquí y en los informes anteriores de nuestro laboratorio (Garcia-Silva et al. 2010) indicarían que una fracción importante de mitades derivadas de ARNt son reclutadas en reservosomas a través de complejas redes vesiculares.

La localización reportada para los fragmentos derivados de ARNt y proteínas asociadas a estos compartimientos sub-celulares nos sugirió su posible participación en una vía endocítica formada por pequeñas vesículas que contienen estas moléculas como carga, entre otras biomoléculas. Además, la presencia de estas moléculas en vesículas que subyacen a la membrana plasmática o incluidas en vesículas secretadas también sugiere su implicación en vías exocíticas. En efecto, hemos podido demostrar que epimastigotes sometidos a estrés nutricional secretaban pequeñas vesículas que van de 20 a 200 nm de diámetro que se desprenden de todo lo largo del cuerpo parasitario y flagelo; y que las mismas incluyen fragmentos derivados de ARNt y la proteína Argonauta TcPIWI-tryp como carga. Todo esto se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido.

Con el objetivo de estudiar y caracterizar el contenido de estas microvesículas pusimos a punto un protocolo de purificación de las mismas que se basa en la incubación de epimastigotes en un medio nutricional pobre, de manera de inducir un estrés que generó una transformación de ~25% de la población a formas metacíclicas. Luego se procedió con la purificación de la fracción de microvesículas liberadas al medio como se detalla en materiales y métodos. Con el fin de conocer el espectro total de pequeños ARNs incluidos en las microvesículas hemos realizado una secuenciación masiva de sARNs purificados de las microvesículas. Nuestros datos revelaron que las poblaciones de pequeños ARNs derivados de ARNr y ARNt contribuyen igualmente con más del 90% de los sARNs cargados en las microvesículas. Por otro lado, es de destacar que ~90% de los fragmentos derivados de ARNt provienen de un grupo restringido de precursores de ARNt incluyendo tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, y tRNA<sup>Arg</sup>, que representa aproximadamente la mitad de los sARNs incluidos en microvesículas secretadas. A su vez, ~56% de estos fragmentos deriva del brazo 3' del ARNt precursor maduro.

Los resultados de los secuenciados masivos comparativos de la fracción intracelular *versus* microvesicular reflejaron que podría existir un patrón molecular específico de sARNs que están siendo secretados por *T. cruzi* contenidos en microvesículas al medio extracelular. Para llegar a estas conclusiones debimos analizar en profundidad las características de las bibliotecas de sARNs obtenidas para ambas fracciones. Nos gustaría puntualizar con respecto a esto que como se describió en resultados hay muchas lecturas que no alinearon con los genomas de *T. cruzi*, por ejemplo en la muestra intracelular, muchas lecturas pueden asignarse a otros tripanosomátidos incluyendo *T. brucei* y *Leishmania*.

El análisis de la fracción de sARNs no alineado en la fracción intracelular reveló que más del 70% de las secuencias alinean con trypanosomátidos (*brucei*, *leishmania*, etc) lo que sugiere que probablemente esto pueda estar asociado a un ensamblado más completo de estos genomas y también las diferencias genómicas de la cepa Dm28c con la referencia clon CL Brenner. Por otro lado, pudimos determinar que por ellos mismos, los sARNs derivados de ARNt y ARNr representan más del 90 % de los esARNs y reflejan una "firma extracelular" específica. Esto puede ser de gran utilidad en futuras aplicaciones biotecnológicas por ejemplo en el diagnóstico

precoz de la enfermedad determinando la presencia de estos sARNs en el suero de pacientes. A su vez, los sARNs derivados de snoRNAs, CDS y snARN también contribuyen a definir un perfil extracelular específico. Lo que nos lleva a especular que contrario a lo que se podría pensar de que el material liberado en microvesículas es una representación del contenido citosólico que está siendo secretado al medio de forma inespecífica tal vez en forma de desecho, la población de sARNs que está siendo liberada en microvesículas es específica y debe estar asociada a un mecanismo activo de selección de estas moléculas para su liberación al medio. Más estudios deben realizarse en diferentes condiciones y con diferentes cepas de *T. cruzi* para verificar que las firmas moleculares extracelulares se mantengan específicas bajo los diferentes contextos estudiados.

Estos resultados difieren con los reportados por el clonado intracelular realizado en mi tesis de maestría y por el del realizado en metacíclicos, donde encontrábamos que los fragmentos derivados de ARNt representan alrededor del 25% de los pequeños ARN intracelulares y más de 90% de ellos derivan de la mitad 5' Asp y Glu (Garcia-Silva et al. 2010). Recientemente, Franzen *et al.* (Franzen et al. 2011) reportaron el transcriptoma de sARNs intracelular del clon CL - Brener el cual es cuali - y cuantitativamente diferente de la que se informó para el clon Dm28c. Sin embargo, no podemos dilucidar si estas diferencias son la consecuencia de los perfiles específicos de la especie o que reflejan las diferencias inducidas por el estrés nutricional en comparación con las condiciones de crecimiento normales del estudio de Franzen *et al.* (Franzen et al. 2011).

Los resultados hallados para las microvesículas podrían indicar que los fragmentos de ARNt incluidos en las mismas se enriquecen no sólo cuantitativamente, sino cualitativamente diferente a su contraparte intracelular, lo cual sugiere un proceso de reclutamiento selectivo más que de un proceso de secreción al azar de una fracción representativa del contenido citoplasmático. Estos datos se pueden comparar con resultados previos que indican que además de miARN y ARNm, otros sARNs también se incluyen en microvesículas y se secretan al medio por diferentes células. En los últimos años, varios estudios han sugerido que los fragmentos derivados de ARNt podrían actuar como moléculas efectoras para regular la expresión génica global, como hemos mencionado anteriormente (Garcia-Silva et al. 2012). Es tentador especular que al igual que la reprogramación epigenética mediada por microvesículas de las células a través de exosomas o ectosomas mediante la transferencia de ARNm y miARNs como un nuevo mecanismo de intercambio genético entre las células, estos fragmentos derivados de ARNt podrían también desempeñar un papel fundamental en la comunicación célula a célula en *T. cruzi* (Valadi et al. 2007; Camussi et al. 2011).

Sorprendentemente ensayos de *transwells* con parásitos marcados con sondas trazadoras derivadas de ARNt dejaron en evidencia que las mitades de ARNt son internalizadas por los parásitos vecinos que se encuentran en el mismo medio. La secreción de microvesículas por tripomastigotes de *T. cruzi* de 20-80 nm fue inicialmente reportada por Gonçalves et al

(Goncalves et al. 1991) en lo que ellos consideraron representaba un mecanismo fisiológico para entregar antígenos de superficie al medio extracelular. Evidencias experimentales más recientes sugieren que las microvesículas secretadas por *T. cruzi* juegan un papel clave en la patogénesis de la enfermedad de Chagas mediante el aumento de parasitismo tisular y la inducción de respuestas inflamatorias fuertes (Trocoli Torrecilhas et al. 2009; Torrecilhas et al. 2012).

En general, nuestros datos sugieren fuertemente que la producción de microvesículas por *T. cruzi* representa una parte integral de una vía endo/ exocítica involucrada en la comunicación de célula a célula, donde los fragmentos derivados de ARNt y TcPIWI-tryp son al menos una de varias moléculas implicadas. Otras proteínas y glicoconjugados también se han encontrado que forman parte de estas microvesículas secretadas, incluyendo miembros de la familia gp85/transialidasas, proteasas como Cruzipaína, proteínas del citoesqueleto, proteínas de superficie asociadas a mucina y una variedad de otras proteínas con funciones conocidas y desconocidas (Frasch 2000; Aparicio et al. 2004; Tribulatti et al. 2005). A principios de este año se publicó un análisis proteómico de las dos grandes fracciones de microvesículas extracelulares secretadas por *T. cruzi* que reveló la presencia de más de 300 proteínas que pertenecen a diferentes vías relevantes, incluidas el tráfico y fusión de membranas, interacción huésped-parásito, señalización y metabolismo entre otras (Bayer-Santos et al. 2013).

El trabajo de Almeida IC *et al* (Bayer-Santos et al. 2013) de proteómica del contenido de microvesículas de la cepa en la cual nos encontrábamos trabajando, se publicó antes de nosotros terminar nuestro propio análisis, por lo que nos propusimos entonces, en colaboración con el laboratorio del Dr. Wanderley de Souza en la UFRJ estudiar que ocurre en otras cepas de *T. cruzi*. Es un fenómeno conocido la gran variabilidad en el espectro de diferentes cepas y tipos de *T. cruzi*, lo cual como mencionamos en resultados, ha dificultado su clasificación y nomenclatura con el correr de los años. Por esto, varios esfuerzos se han destinado a poder encontrar marcadores taxonómicos de dichos parásitos. Una última versión de un intento de clasificación se encuentra en (Zingales et al. 2009).

En el presente trabajo realizamos ensayos proteómicos y transcriptómicos de pequeños ARNs contenidos en microvesículas secretadas por diferentes cepas de *T. cruzi*. Pusimos especial énfasis en intentar detectar si las diferencias que se observan entre estas cepas, principalmente en cuanto a su capacidad de infección y su virulencia podrían reflejarse de alguna manera en el contenido de microvesículas secretadas por el estadio infectivo de las mismas. Se eligieron tres representantes de algunos de los diferentes tipos de *T. cruzi* que se reconocen actualmente: *T. cruzi* cepa Y (Tipo II), *T. cruzi* clone CL-Brener (TipoVI) y *T. cruzi* clon Dm28c (Tipo I) (Zingales et al. 2009).

Los resultados del análisis proteómico obtenido, a nivel de la distribución de categorías funcionales de las proteínas identificadas, para las microvesículas de tripomastigotes de las diferentes cepas de *T. cruzi*, no reveló diferencias significativas entre dichas categorías entre cepas. Estos resultados indicarían que el contenido proteico de las microvesículas secretadas por

las diferentes cepas de *T. cruzi* es muy similar, no pudiéndose explicar “*a priori*” las diferencias observadas dentro de esta especie por diferencias en estos constituyentes. Esto podría estar indicando que la secreción de proteínas contenidas en microvesículas y las vías en las cuales estas participan es un fenómeno conservado evolutivamente entre las diferentes cepas. El mismo pudo haber surgido antes de la diferenciación de los tipos en los cuales se subdividen hoy *T. cruzi*.

Al análisis proteómico del contenido de microvesículas le siguieron ensayos de transcriptómica de sARNs para caracterizar las poblaciones presentes en las microvesículas secretadas por las diferentes cepas. El secuenciado masivo de estas muestras reveló que las poblaciones de ARN contenidas en dichas microvesículas varían entre muestras. El análisis de las poblaciones de sARNs presentes por longitud de secuencia mostró que los perfiles entre cepas son levemente diferentes. Para los fragmentos derivados de ARNm no se observaron diferencias, presentando para ambas muestras un perfil similar a lo que se espera como resultado de degradación por ribonucleasas. Por otro lado la distribución correspondiente a fragmentos derivados de ARNr y ARNt si parece ser diferente entre cepas. CL-Brener presenta un perfil de fragmentos derivados de ARNr sin picos pronunciados, lo que refleja una distribución similar a la de degradación, sin embargo para los fragmentos derivados de ARNt se observo un pico de clivado específico en la región de ~27nts. En el caso de Y, tanto los fragmentos derivados de ARNr como de ARNt presentan picos característicos de clivados específicos. Siendo para los fragmentos derivados de ARNr entre ~25-27nts y para los derivados de ARNt dos picos uno correspondiente a secuencias más cortas de ~25-27nts y otro correspondiente a secuencias más largas de ~33nts.

El análisis para cada tipo de ARN reveló que la composición de ARN de las microvesículas es similar entre cepas no así la abundancia relativa de cada clase genómica de sARNs contenidos en las mismas. Las microvesículas de la cepa Y se integran principalmente por fragmentos derivados de ARNr; sin embargo, para CL-Brener es casi 50% para fragmentos de ARNm y de ARNr y para Dm28c es un panorama similar 50-50% pero en este caso para fragmentos derivados de ARNt y ARNr. Como primera conclusión, estos análisis se demostraron que efectivamente el perfil de carga de sARNs presente en microvesículas de diferentes cepas es ligeramente diferente. Esto podría estar induciendo tanto en la población de parásitos que las recibe como en su huésped diferentes señales que podrían o no responder a diferentes fenotipos observados para estas cepas. Más estudios deben realizarse para poder verificar estas hipótesis, nuestros resultados hasta ahora son solamente descriptivos y servirían para la caracterización del secretoma diferencial entre cepas de *T. cruzi*, lo cual hasta ahora no ha sido estudiado.

Como conclusión final de estos ensayos, se podría afirmar que a nivel del contenido de microvesículas secretadas por diferentes cepas de *T. cruzi*, se observan diferencias en el contenido génico de sARNs presente en las microvesículas secretadas pero no así en la carga

proteica de las mismas. Esto podría indicar una evolución más tardía con especialización diferente de las vías mediadas por sARNs secretadas para diferentes cepas de *T. cruzi* debido tal vez a las diferentes presiones ambientales que sufren estos parásitos.

Como hemos mencionado anteriormente en esta tesis, actualmente se acepta que los exosomas y microvesículas mayores (ectosomas) sirven como medio de entrega de información genética y proteínas entre células y que juegan un papel fundamental en la comunicación de célula a célula (Cocucci et al. 2009; Camussi et al. 2010). En un elegante estudio, Valadi *et al.* (Valadi et al. 2007) reportaron que los exosomas de diferentes células de mamífero llevan al menos 1.300 ARNm y más de 120 miARNs conocidos y otros sARNs no caracterizados. Curiosamente, estos ARNm exosomales y miARNs son completamente funcional en las células receptoras. Como hemos mencionado en nuestro trabajo, mediante el uso de ribo-sondas sintéticas derivadas de ARNt de Glu y Asp como moléculas trazadoras marcadas hemos podido demostrar que tanto los fragmentos derivados de ARNt como TcPIWI-tryp son transferidos contenidos en microvesículas de manera eficiente entre parásitos. Hemos hallado evidencias experimentales que sugieren fuertemente que las microvesículas facilitan o promueven la metacicloogénesis. Estos resultados sugieren que estas microvesículas y su carga representan una vía de comunicación intercelular de entrega de "mensajes moleculares" para otras células destinadas a inducir respuestas coordinadas para hacer frente a las condiciones ambientales adversas y asegurando así la supervivencia del parásito a través de la aparición de las formas infectivas.

De acuerdo con esta idea, se reportó recientemente que en las células tanto fagocíticas como no fagocíticas, el proceso de entrada de *T. cruzi* en la célula huésped es drásticamente disminuida cuando las células anfitrionas son tratadas con Dynasore, un potente inhibidor de la endocitosis Dinamina-dependiente a nivel de membrana plasmática (Barrias et al. 2010) y cuya actividad se describió en la sección de resultados. En nuestro trabajo probamos el efecto de la droga Dynasore en la secreción/endocitosis de microvesículas de *T. cruzi* midiendo la producción de microvesículas de los parásitos sometidos a dicha droga por un lado, y por el otro, observando y contabilizando las formas metacíclicas que aparecen en el medio luego de los tratamientos. Nuestros resultados demostraron que en un rango de concentración menor a 25 $\mu$ M Dynasore actúa en *T. cruzi* disminuyendo la producción de microvesículas por los parásitos por un lado, y por el otro en esa misma ventana de concentraciones de droga también se observaron menos formas metacíclicas en el cultivo. A concentraciones mayores de droga los efectos no son tan claros, esto podría deberse a que se está disparando algún otro mecanismo de respuesta a estrés que interfiere con lo que queremos cuantificar. De cualquier forma, estos resultados preliminares nos permiten discutir en primera instancia que Dinamina y Clatrina podrían ser dos elementos involucrados en la secreción y endocitosis de este tipo de microvesículas estudiadas en *T. cruzi*, y que efectivamente la disminución de la producción de estas microvesículas afecta la metacicloogénesis (disminuyéndola) de este parásito.

Una vez detectado un cambio fenotípico (aumento de metaciclogenesis) causado por las microvesículas al ser engullidas por otros parásitos, nos propusimos poder determinar si existían algunos genes candidatos responsables para este cambio. Para ello elegimos estudiar dos genes con los que trabajaban laboratorios con los cuales colaboramos, TcSof1 y TcGalNac2. Como mencionamos en resultados, TcSof1, es una proteína asociada al proteosoma, la cual se ha descrito se encuentra regulada a nivel traduccional durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, y disminuye su expresión durante la metaciclogenesis, pero el mecanismo de control de su expresión no ha sido completamente dilucidado (Nardelli et al. 2007). Por otro lado, TcGalNac2, es una glicosil transferasa responsable de la formación del cáliz de glicanos que cubre la superficie de *T. cruzi*; la misma se encuentra expresada diferencialmente a lo largo del ciclo de vida del parásito, y su sobre-expresión aumenta la infectividad de *T. cruzi* (Chiribao et al. 2012). El análisis bioinformático para la predicción de sitios semilla de apareamiento de nuestras mitades de ARNt<sup>Asp</sup> y el ARNm de cada uno de los genes estudiados reveló que ambos genes analizados presentaban regiones semillas para nuestros sARNs. Estos resultados indicarían que a nivel de secuencia es probable que estos genes sean blancos para nuestros sARNs.

Estos resultados intentaron ser validados *in vitro* posteriormente mediante ensayos *western blot* para la detección de TcSof1 y TcGalNac 2 en los extractos de parásitos *wild type*, sobre-expresantes y *knock down* para mitades de ARNt<sup>Asp</sup>. La detección de estas proteínas en las diferentes muestras fue complicada, y no pudimos concluir fielmente sobre estos resultados. A primera vista los mejores resultados podrían indicar que los dos genes estudiados aumentaron su expresión en las parásitos donde las mitades de ARNt<sup>Asp</sup> se encontraban inhibidas por la sonda antisentido. Estos ensayos deben seguir siendo puestos a punto con el fin de poder concluir más claramente sobre esta hipótesis. Pero sería una de las primeras demostraciones experimentales de sARNs no canónicos regulando genes de interés para el ciclo de vida de estos parásitos. Como primera experiencia pretendemos sustituir los ensayos de *western blot* (que no fueron concluyentes) por ensayos con vectores portadores de estos sitios blancos y genes reporteros, por ejemplo mediante el sistema luciferasa, que indicarían *in vitro* si efectivamente la semilla elegida es blanco de nuestros sARNs.

La idea de que la transferencia de la carga de las microvesículas de *T. cruzi* a células de mamíferos estaría involucrada en la susceptibilidad a la infección podría revelar vías novedosas que colaboren en dilucidar los mecanismos moleculares implicados en la infección por *T. cruzi* en las células huésped. Sorprendentemente, mediante el uso de *transwells*, en un ensayo similar al realizado para parasito-parasito, con ribo-sondas sintéticas marcadas derivadas de ARNt de Glu y Asp como moléculas trazadoras, hemos podido demostrar que tanto los fragmentos derivados de ARNt como TcPIWI-tryp son transferidos contenidos en microvesículas de manera eficiente a células Vero y HeLa susceptibles a la infección por *T. cruzi*. De acuerdo con esta idea, un reciente trabajo de Torrecilhas *et al.* (Torrecilhas et al. 2012) muestra que las microvesículas de *T. cruzi* son engullidas por células de mamíferos susceptibles en ausencia de parásitos viables, similar a lo mostrado en nuestros resultados. Sin embargo, las estructuras o biomoléculas

(por ejemplo, membranas, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que no sean pequeños ARNt) que participan en estos procesos aún no han sido completamente dilucidadas. De hecho, los últimos resultados publicados por Torrecilhas *et al.* (Torrecilhas *et al.* 2012) revelaron que tripomastigotes de *T. cruzi* son capaces de invadir cinco veces más a sus células susceptibles cuando las células se pre-incubaron con microvesículas purificadas de parásitos. Esto sugiere que las microvesículas secretadas por *T. cruzi* y su carga podrían actuar como factores de virulencia promoviendo por un lado la metacicloogénesis, mejorando la susceptibilidad de las células huésped o ambos. Sin embargo, estas hipótesis aún no se han sido validadas.

Con el objetivo de poder determinar si la incorporación del contenido de las microvesículas secretadas por *T. cruzi* en sus células huésped tenía alguna consecuencia, realizamos ensayos de microarreglos para identificar si había cambios a nivel transcriptómico luego de la incorporación de esta carga. Para comenzar, una serie de ensayos se llevó a cabo con el fin de determinar las condiciones óptimas para estudiar la interacción entre microvesículas de *T. cruzi* y células HeLa. Nuestros resultados mostraron claramente que la carga de las microvesículas es incorporada por células HeLa en tan solo 30 minutos con un patrón citoplasmático difuso que adopta una disposición granular luego de transcurridas de 2 horas. El análisis cinético basado en microarreglos que se realizó reveló que las células HeLa responden a la incorporación de microvesículas de *T. cruzi* con cambios significativos en los patrones de expresión de sus genes y que dichos cambios duran por lo menos 72 horas.

Se encontró que la incorporación de las microvesículas secretadas por *T. cruzi* producen en células HeLa un cambio de un total de 743 genes únicos expresados diferencialmente con un nivel de cambio en su expresión  $\geq 3$  y un nivel de significación de  $\leq 0,05$ . Se observó que esta interacción provoca una respuesta que es más marcada a las 6 horas después del tratamiento, manteniéndose después de 24 horas y decayendo hacia las 72 horas, donde la mayoría de los ARNm celulares modificados volvieron a los niveles basales. Los resultados obtenidos parecen indicar que las microvesículas secretadas por *T. cruzi* son capaces de desencadenar un cambio importante en el perfil de expresión génica del huésped.

Recientemente, la captación de microvesículas producidas por otros parásitos se ha encontrado es capaz de activar las transiciones del ciclo de vida y de participar en la promoción de la susceptibilidad a la infección de las células huésped (Deolindo *et al.* 2013; Inal *et al.* 2013). En resumen, las pruebas reunidas hasta ahora parecen indicar que *T. cruzi* secreta microvesículas que pueden "preparar" a sus células huésped para la invasión, ya sea a través de la interacción con la superficie celular o mediante su internalización. Teniendo en cuenta que la interacción entre las microvesículas y las células huésped se llevaría a cabo con anterioridad a la interacción directa con los propios parásitos, es posible que los cambios que provocan se lleven a cabo con bastante rapidez. Además, si el papel de las microvesículas es el de facilitar la entrada del parásito en la célula, puede que no sea necesario que el efecto de las mismas se sostenga en el tiempo, ya que una vez que la infección se ha logrado, los propios parásitos representarían

estímulos suficiente para continuar con la proceso de infección. En nuestros ensayos los parásitos están ausentes a lo largo de todo el experimento, lo que permite la observación del decaimiento de la respuesta en el tiempo.

Observamos que las microvesículas son capaces de inducir una respuesta preparatoria amplia modificando el citoesqueleto de la célula huésped, la matriz extracelular y las vías de respuesta inmune. A continuación describiremos algunas de las vías que encontramos modificadas que nos resultaron de interés. Destacamos el caso de la vía de señalización Rho GTPasa afectada tanto a las 6 como a las 24 horas después del tratamiento. Los genes que pertenecen a esta vía fueron modificados de una manera que mantendría esta vía de señalización inactiva. Esta familia de proteínas coordina y regula los aspectos relacionados con la morfología celular y la motilidad, a través de reorganizaciones del citoesqueleto. Cuando está activa, esta vía induce la polimerización de actina (Jaffe and Hall 2005). La reorganización del citoesqueleto ha sido reconocida como uno de los principales procesos que tienen lugar durante la entrada del parásito, con la de-polimerización de actina como facilitador de dicha entrada (Epting et al. 2010). Futuros experimentos en células tratadas con microvesículas son necesarios para evaluar si la de-polimerización tiene lugar realmente en los puntos temporales evaluados aquí.

Las metaloproteinasas de matriz (MPM) son responsables de la remodelación de la matriz extracelular (MEC). En nuestro análisis se encontró que las MPMs se alteran 24 horas después del tratamiento con microvesículas. Sorprendentemente, una MPM y 2 inhibidores de MPM (TIMP) resultaron ser sobre-expresados luego del tratamiento. El parásito secreta proteasas capaces de degradar el MEC y por lo tanto favorecer el proceso de invasión (Maeda et al. 2012). Parece posible que las microvesículas estimulen la expresión de MPMs con el fin de facilitar la degradación de la MEC antes de que los parásitos lleguen y completen el proceso con sus propias proteasas y por lo tanto favorecer el proceso de invasión. La co-expresión de TIMP puede representar la respuesta de las células a un aumento inesperado de las MPMs correspondientes.

A pesar del hecho de que las microvesículas de *T. cruzi* parecen favorecer el establecimiento de un ambiente celular favorable a la infección mediante cambios en la expresión génica del huésped, las células no permanecen insensible y pueden contrarrestar estos cambios. En este sentido, se encontró que la vía de señalización del receptor NOD pasa a ser activado a las 6 y 24 horas después del tratamiento. A su vez, los ARNm implicados en la transducción de señales (IL-6, IL-18, CCL2, CXCL2) resultaron estar sobre-expresados luego del tratamiento. Parece probable que las células sean capaces de percibir la presencia de moléculas extrañas dentro del citoplasma y responder a estas señales mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias e interleuquinas. Estrechamente relacionado con NOD se encuentra la vía de señalización de la IL-1, que fue encontrada alterada a las 24 horas después de la incubación con microvesículas.

Manque y colaboradores (Manque et al. 2011) demostraron mediante análisis de microarreglos que el perfil de expresión de cardiomiocitos murinos se ve muy afectado durante

las primeras etapas de la invasión y de infección por tripomastigotes de *T. cruzi*. Similar a lo que nosotros reportamos para lo sucedido con la incubación con las microvesículas, la remodelación del citoesqueleto y de la MEC fueron algunos de los procesos que los autores encuentran más sensibles al efecto de la invasión por el parásito, así como la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y otros genes implicados en la respuesta inmune.

A continuación nos propusimos determinar cuánto del cambio observado con la incubación de las microvesículas enteras es debido solamente a la carga de alguno de los fragmentos derivados de ARNt mas representados en las microvesículas. Para ello usamos dos ARNt, mitades derivadas de Thr y de Leu, los cuales representan más del 60% de la carga de sARNs de las microvesículas de *T. cruzi* (como mencionamos anteriormente como resultado del secuenciado masivo del contenido de las microvesículas). Con el fin de evaluar su potencial efecto en las células huésped, se transfectaron células HeLa con sondas sintéticas fluorescentes para mitades de ARNtThr, mitades de ARNtLeu y sus correspondientes secuencias barajadas como controles. El análisis de los datos reveló que 24 horas después de la transfección, con las mitades del ARNtLeu se modificaron específicamente tres genes (MTERFD2, LMBRD2 y PRELID2) con un nivel de cambio mayor a 1; siendo LMBRD2 y PRELID2 compartidos con los genes modificados por microvesículas enteras. Por otro lado, la sonda para mitades de ARNtThr modificó significativamente 12 genes con un nivel de cambio  $\geq 2$ , de los cuales 5 genes (ATF3, LNX2, PRAME, CXCL2 y DUSP6) de estos 12 genes también fueron modificados por las microvesículas enteras. Decidimos centrar nuestro análisis en estos cinco genes ya que el nivel en el cambio de expresión fue mayor que 2 y los mismos pueden ser relevantes en el contexto huésped-parásito, como discutiremos a continuación.

ATF3 es un factor de transcripción dependiente de AMPc, cuya expresión es inducida debido a señales de estrés tales como citoquinas, la falta de nutrientes y la infección bacteriana. ATF3 es capaz tanto de activar como de reprimir la transcripción de sus genes diana, que participan en los mecanismos de defensa celular y en la respuesta inmune contra patógenos (Thompson et al. 2009; Rynes et al. 2012). LNX2 fue identificado inicialmente junto con LNX1 como proteínas de andamiaje en el refuerzo en la localización subcelular de proteínas no relacionadas que interactúan entre sí (Rice et al. 2001). A pesar de que no hay mucha información disponible con respecto a su función, LNX2 se ha visto que tiene actividad E3-ubiquitin-ligasa con un papel en la regulación de los niveles de CD8 en la superficie de células T (D'Agostino et al. 2011). También se la ha identificado como un oncogén en cáncer colorrectal, participando en las vías de señalización Notch y Wnt (Camps et al. 2013). Por su lado, PRAME es un antígeno reconocido por células T citotóxicas, que se encuentra prácticamente ausente en las células normales, pero que está altamente expresado en tumores malignos. Se ha reportado que el mismo puede actuar como un represor de la vía de señalización del ácido retinoico, cuyos genes efectores regulan la diferenciación celular, detención del ciclo celular y apoptosis. Además, contiene repeticiones ricas en leucina similares a las encontradas en Line y NOD como receptores, por lo que se especula que podría estar involucrado de alguna manera en la respuesta

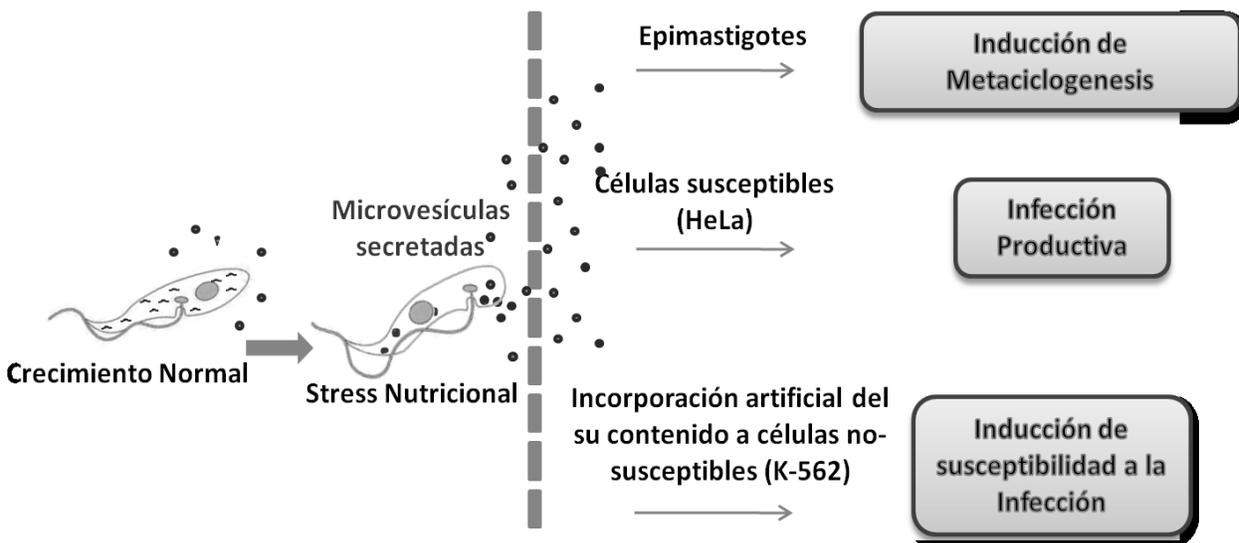
inmune (Wadelin et al. 2010). CXCL2 es un miembro de la familia de las citoquinas C-X-C, reconocido como mediador clave de los procesos inflamatorios (da Silva et al. 2012). Por último, DUSP6 es una fosfatasa de especificidad dual, que pertenece al grupo MAPK, con especificidad para las quinasas reguladas por señales extracelulares, cuya actividad inhibe procesos en relación a la adhesión, el crecimiento, la proliferación, la regulación del citoesqueleto y la supervivencia (Caunt and Keyse 2013).

El análisis bioinformático de supuestos sitios "semillas" o secuencias de unión complementarias para los fragmentos derivados del ARNt<sup>Thr</sup> estudiados de *T. cruzi* en cinco de los genes modificados en HeLa reveló que los dichos genes (ATF3, LNX2, PRAME, CXCL2 y DUSP6) tienen posibles sitios de unión para la sonda utilizada en nuestros experimentos. Esto podría implicar que estos genes son blancos directos de estos sARNs. El modo de acción de estos sARNs no está completamente dilucidado, a pesar de ciertas evidencias que indican que regulan la expresión génica a través de la inhibición del inicio de la traducción y posiblemente dirigen la degradación específica de los ARNm a través de mecanismos que aún no han sido revelados (Yamasaki et al. 2009; Ivanov et al. 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos aquí no muestran una participación en la regulación a la baja de las mitades de ARNt. Por el contrario, los genes que se han encontrado modificados fueron en su mayoría sobre-expresados con la incorporación de la sonda usada. Es posible que la sobre-expresión sea un efecto aguas abajo de otros blancos modificados, a pesar de los posibles sitios de unión que fueron encontrados por predicción bioinformática. Alternativamente, la unión de estos sARNs con su ARNm diana podría inducir una sobre-expresión, como se ha reportado en algunos miARNs en condiciones celulares particulares (Vasudevan 2012). Como en el caso de los genes modificados en el parásito, otros estudios con genes reporteros y sitios de unión para estos sARNs en sus promotores deben llevarse a cabo para validar esta hipótesis.

Como hemos mencionado, podemos especular que las microvesículas secretadas por *T. cruzi* podrían tener un papel en la promoción o el favorecimiento de la infección de células de mamíferos por el parásito. En efecto, la electroporación del contenido de microvesículas de *T. cruzi* en células K562 no susceptibles a la infección por *T. cruzi*, las transformó en susceptibles a la infección por el parásito. Sin embargo, los parásitos internalizados por las células K562 no parecieron poder completar su ciclo de vida debido a la ruptura prematura de la membrana plasmática con la posterior liberación de formas redondeadas que se asemejan a formas amastigotes. Las formas amastigotes han demostrado ser relevantes en el ciclo infeccioso de este parásito. A este respecto, se sabe que los amastigotes extracelulares son infecciosos lo que indican que se podría iniciar con estos un sub-ciclo alternativo dentro del ciclo de vida del parásito en células de mamífero (Ley et al. 1988).

Un esquema que resume los resultados mostrados en la presente tesis y los posibles fenómenos involucrados con nuestros hallazgos se muestra en la **Figura 41**. Resumiendo, los epimastigotes de *T. cruzi* producen fragmentos de ARNt citoplasmáticamente que liberan al

medio extracelular a través de microvesículas. Cuando se los somete a estrés nutricional, por ejemplo en el intestino del insecto vector, los mismos comienzan su transformación y también liberan más microvesículas al medio las cuales: por un lado, estimularían la formación de más formas metacíclicas, por otro, en su célula huésped, favorecerían una infección productiva y aumentarían la susceptibilidad de las mismas.



**Figura 41: Esquema que resume los resultados presentados en esta tesis y las hipótesis que se generaron.** En el texto se encuentra una explicación detallada.

Además, la transferencia de proteínas y material genético de protistas a células de mamífero es un campo emergente que nos podría conducir a replantearnos algunos conceptos de biología en general. Nuestros resultados ofrecen nuevas piezas pertinentes de evidencia sobre el papel de las microvesículas secretadas en la biología del parásito, especialmente en las transiciones del ciclo de vida, la infectividad y la comunicación célula a célula, lo que sin duda puede contribuir a obtener una visión más detallada de los mecanismos moleculares implicados en la interacción huésped-parásito.

Para terminar nos gustaría destacar que uno de los temas más intrigantes que encontramos, es la relevancia biológica de estos fragmentos derivados de ARNts. El proceso de clivaje de ARNts parece encontrarse conservado tanto en procariotas como en eucariotas, frecuentemente se lo ha encontrado asociado a estrés nutricional, biológico o fisicoquímico, como hemos mencionado. Los fragmentos de ARNts descritos aquí parecen tener un rol más allá del lugar donde se originan, migrando contenidos en microvesículas a otros parásitos y a sus células huésped. A su vez, estas moléculas parecen ser funcionales y tener consecuencias fenotípicas a través de la producción de cambios a nivel de la expresión génica de sus células receptoras.

#### 4.1 Impacto esperado de los resultados y perspectivas.

Colaborar con la descripción de nuevas vías de regulación de la expresión génica, no bien entendidas al momento actual, sería de gran impacto en biología básica. Así mismo, esto podría ayudar a resolver problemas aún no resueltos de la biología de estos parásitos, desde nuevos elementos para su clasificación taxonómica hasta la generación de nuevas estrategias de tratamiento para enfermedades parasitarias que afectan al ser humano.

Como perspectivas principales al momento de presentar este trabajo se intentará concentrar nuestros estudios en ensayos del tipo de genómica funcional con los objetivos de profundizar en caracterizar los mecanismos que subyacen la biología de estos fragmentos de ARNt. Enfocándonos principalmente en la caracterización y descripción de sus blancos tanto a nivel del parásito como de su célula huésped.

Por otro lado con lo que respecta al mundo de las microvesículas, se abre todo un campo de estudio que puede permitir el desarrollo de diferentes herramientas para la biología de enfermedades parasitarias, desde un mejorado diagnóstico hasta posibles tratamientos. Estas aplicaciones ya tienen su contraparte por ejemplo en modelos de cáncer.

*"Lo importante es no dejar de hacerse preguntas."*

*A.Einstein.*

## Abreviaturas.

ARNnc: ARN no codificante.

ARNr: ARN ribosomal.

ARNt: ARN transferencia.

ARNm: ARN mensajero.

snARN: ARN pequeño nuclear.

snoARN: ARN pequeño nucleolar.

miARNs: micro ARNs

sARNs: ARNs reguladores no codificantes pequeños.

siARNs: pequeños ARNs de interferencia.

miARNs: micro ARNs.

piARNs: ARN pequeños asociados a proteínas Piwi.

ARNdc: ARN doble cadena.

ARNsc: ARN simple cadena

tRFs: Fragmentos derivados de ARNt.

MVBs: Cuerpos multivesiculares.

ARNes/esARNs: ARN extracelular secretado.

LIT: Liver Infusion Tryptose.

SBF: Suero Bovino Fetal.

ADNc: ADN copia.

GA: Glutaraldehído.

## Referencias.

- Alberts, B. (2002). Molecular Biology of the cell. New York, Garland.
- Allen, C. L., D. Goulding and M. C. Field (2003). "Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*." EMBO J 22(19): 4991-5002.
- Allen, E., Z. Xie, A. M. Gustafson, G. H. Sung, J. W. Spatafora and J. C. Carrington (2004). "Evolution of microRNA genes by inverted duplication of target gene sequences in *Arabidopsis thaliana*." Nat Genet 36(12): 1282-1290.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2006). "RNA granules." J Cell Biol 172(6): 803-808.
- Andrade, L. O. and N. W. Andrews (2005). "The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention." Nat Rev Microbiol 3(10): 819-823.
- Aparicio, I. M., J. Scharfstein and A. P. Lima (2004). "A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes." Infect Immun 72(10): 5892-5902.
- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, E. M. Kroh, I. K. Ruf, C. C. Pritchard, D. F. Gibson, P. S. Mitchell, C. F. Bennett, E. L. Pogosova-Agadjanyan, D. L. Stirewalt, J. F. Tait and M. Tewari (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." Proc Natl Acad Sci U S A 108(12): 5003-5008.
- Atayde, V. D., C. Tschudi and E. Ullu (2011). "The emerging world of small silencing RNAs in protozoan parasites." Trends Parasitol.
- Barrett, M. P., R. J. Burchmore, A. Stich, J. O. Lazzari, A. C. Frasch, J. J. Cazzulo and S. Krishna (2003). "The trypanosomiasis." Lancet 362(9394): 1469-1480.
- Barrias, E. S., L. C. Reignault, W. De Souza and T. M. Carvalho (2010). "Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages." PLoS One 5(1): e7764.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-297.
- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." Nature 431(7006): 356-363.
- Bayer-Santos, E., C. Aguilar-Bonavides, S. P. Rodrigues, E. M. Cordero, A. F. Marques, A. Varela-Ramirez, H. Choi, N. Yoshida, J. F. da Silveira and I. C. Almeida (2013). "Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins." J Proteome Res 12(2): 883-897.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." Nature 409(6818): 363-366.
- Bohmert, K., I. Camus, C. Bellini, D. Bouchez, M. Caboche and C. Benning (1998). "AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development." Embo J 17(1): 170-180.
- Bonaldo, M. C., T. Souto-Padron, W. de Souza and S. Goldenberg (1988). "Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation." J Cell Biol 106(4): 1349-1358.

- Brennecke, J., A. A. Aravin, A. Stark, M. Dus, M. Kellis, R. Sachidanandam and G. J. Hannon (2007). "Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*." Cell 128(6): 1089-1103.
- Buchon, N. and C. Vaury (2006). "RNAi: a defensive RNA-silencing against viruses and transposable elements." Heredity 96(2): 195-202.
- Burroughs, A. M., Y. Ando, M. J. de Hoon, Y. Tomaru, H. Suzuki, Y. Hayashizaki and C. O. Daub (2011). "Deep-sequencing of human Argonaute-associated small RNAs provides insight into miRNA sorting and reveals Argonaute association with RNA fragments of diverse origin." RNA Biol 8(1): 158-177.
- Cai, P., X. Piao, N. Hou, S. Liu, H. Wang and Q. Chen (2012). "Identification and characterization of argonaute protein, Ago2 and its associated small RNAs in *Schistosoma japonicum*." PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1745.
- Camps, J., J. J. Pitt, G. Emons, A. B. Hummon, C. M. Case, M. Grade, T. L. Jones, Q. T. Nguyen, B. M. Ghadimi, T. Beissbarth, M. J. Difilippantonio, N. J. Caplen and T. Ried (2013). "Genetic amplification of the NOTCH modulator LNX2 upregulates the WNT/beta-catenin pathway in colorectal cancer." Cancer Res 73(6): 2003-2013.
- Camussi, G., M. C. Deregibus, S. Bruno, V. Cantaluppi and L. Biancone (2010). "Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication." Kidney Int 78(9): 838-848.
- Camussi, G., M. C. Deregibus, S. Bruno, C. Grange, V. Fonsato and C. Tetta (2011). "Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells." Am J Cancer Res 1(1): 98-110.
- Carmell, M. A., Z. Xuan, M. Q. Zhang and G. J. Hannon (2002). "The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis." Genes Dev 16(21): 2733-2742.
- Carninci, P. and Y. Hayashizaki (2007). "Noncoding RNA transcription beyond annotated genes." Curr Opin Genet Dev 17(2): 139-144.
- Cassola, A. (2011). "RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case." Curr Chem Biol 5(2): 108-117.
- Cassola, A., J. G. De Gaudenzi and A. C. Frasch (2007). "Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes." Mol Microbiol 65(3): 655-670.
- Caunt, C. J. and S. M. Keyse (2013). "Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling." FEBS J 280(2): 489-504.
- Cerutti, H. and J. A. Casas-Mollano (2006). "On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man." Curr Genet.
- Chiribao, M. L., M. G. Libisch, E. Osinaga, A. Parodi-Talice and C. Robello (2012). "Cloning, localization and differential expression of the *Trypanosoma cruzi* TcOGNT-2 glycosyl transferase." Gene 498(2): 147-154.
- Chu, C. Y. and T. M. Rana (2007). "Small RNAs: regulators and guardians of the genome." J Cell Physiol 213(2): 412-419.
- Cocucci, E., G. Racchetti and J. Meldolesi (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." Trends Cell Biol 19(2): 43-51.
- Cole, C., A. Sobala, C. Lu, S. R. Thatcher, A. Bowman, J. W. Brown, P. J. Green, G. J. Barton and G. Hutvagner (2009). "Filtering of deep sequencing data reveals the existence of abundant Dicer-dependent small RNAs derived from tRNAs." RNA 15(12): 2147-2160.

- Collins, K. (2006). "The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes." Nat Rev Mol Cell Biol 7(7): 484-494.
- Contreras, V. T., T. C. Araujo-Jorge, M. C. Bonaldo, N. Thomaz, H. S. Barbosa, N. Meirelles Mde and S. Goldenberg (1988). "Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media." Mem Inst Oswaldo Cruz 83(1): 123-133.
- Correa, J. R., G. C. Atella, R. S. Menna-Barreto and M. J. Soares (2007). "Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites." J Eukaryot Microbiol 54(3): 297-302.
- Cortez, M. A., C. Bueso-Ramos, J. Ferdin, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood and G. A. Calin (2011). "MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers." Nat Rev Clin Oncol 8(8): 467-477.
- Cougot, N., S. Babajko and B. Seraphin (2004). "Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells." J Cell Biol 165(1): 31-40.
- Couvillion, M. T., G. Bounova, E. Purdom, T. P. Speed and K. Collins (2012). "A Tetrahymena Piwi bound to mature tRNA 3' fragments activates the exonuclease Xrn2 for RNA processing in the nucleus." Mol Cell 48(4): 509-520.
- Couvillion, M. T., R. Sachidanandam and K. Collins (2010). "A growth-essential Tetrahymena Piwi protein carries tRNA fragment cargo." Genes Dev 24(24): 2742-2747.
- Cunha-e-Silva, N., C. Sant'Anna, M. G. Pereira, I. Porto-Carreiro, A. L. Jeovanio and W. de Souza (2006). "Reservosomes: multipurpose organelles?" Parasitol Res 99(4): 325-327.
- D'Agostino, M., G. Tornillo, M. G. Caporaso, M. V. Barone, E. Ghigo, S. Bonatti and G. Mottola (2011). "Ligand of Numb proteins LNX1p80 and LNX2 interact with the human glycoprotein CD8alpha and promote its ubiquitylation and endocytosis." J Cell Sci 124(Pt 21): 3545-3556.
- da Silva, J. B., E. Carvalho, A. E. Covarrubias, A. T. Ching, V. G. Mattaraia, D. Paiva, M. de Franco, R. D. Favaro, M. M. Pereira, S. Vasconcellos, T. T. Zorn, P. L. Ho and E. A. Martins (2012). "Induction of TNF-alfa and CXCL-2 mRNAs in different organs of mice infected with pathogenic *Leptospira*." Microb Pathog 52(4): 206-216.
- De Lange, T., P. A. Michels, H. J. Veerman, A. W. Cornelissen and P. Borst (1984). "Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence." Nucleic Acids Res 12(9): 3777-3790.
- De Souza, W. (2002). "From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality." Kinetoplastid Biol Dis 1(1): 3.
- de Souza, W., T. U. de Carvalho, M. Benchimol and E. Chiari (1978). "*Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake." Exp Parasitol 45(1): 101-115.
- de Souza, W., C. Sant'Anna and N. L. Cunha-e-Silva (2009). "Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa." Prog Histochem Cytochem 44(2): 67-124.
- Deborde, S., E. Perret, D. Gravotta, A. Deora, S. Salvarezza, R. Schreiner and E. Rodriguez-Boulan (2008). "Clathrin is a key regulator of basolateral polarity." Nature 452(7188): 719-723.
- Deolindo, P., I. Evans-Osses and M. I. Ramirez (2013). "Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication." Biochem Soc Trans 41(1): 252-257.

- Deutscher, M. P. (2006). "Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA." *Nucleic Acids Res* 34(2): 659-666.
- Djikeng, A., S. Shen, C. Tschudi and E. Ullu (2004). "Analysis of gene function in *Trypanosoma brucei* using RNA interference." *Methods Mol Biol* 265: 73-83.
- Durand-Dubief, M. and P. Bastin (2003). "TbAGO1, an argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*." *BMC Biol* 1: 2.
- Eddy, S. R. (2001). "Non-coding RNA genes and the modern RNA world." *Nat Rev Genet* 2(12): 919-929.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, E. Caler, H. Renaud, E. A. Worthey, C. Hertz-Fowler, E. Ghedin, C. Peacock, D. C. Bartholomeu, B. J. Haas, A. N. Tran, J. R. Wortman, U. C. Alsmark, S. Angiuoli, A. Anupama, J. Badger, F. Bringaud, E. Cadag, J. M. Carlton, G. C. Cerqueira, T. Creasy, A. L. Delcher, A. Djikeng, T. M. Embley, C. Hauser, A. C. Ivens, S. K. Kummerfeld, J. B. Pereira-Leal, D. Nilsson, J. Peterson, S. L. Salzberg, J. Shallom, J. C. Silva, J. Sundaram, S. Westenberger, O. White, S. E. Melville, J. E. Donelson, B. Andersson, K. D. Stuart and N. Hall (2005). "Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa." *Science* 309(5733): 404-409.
- Elbarbary, R. A., H. Takaku, N. Uchiumi, H. Tamiya, M. Abe, M. Takahashi, H. Nishida and M. Nashimoto (2009). "Modulation of gene expression by human cytosolic tRNase Z(L) through 5'-half-tRNA." *PLoS One* 4(6): e5908.
- Emara, M. M., P. Ivanov, T. Hickman, N. Dawra, S. Tisdale, N. Kedersha, G. F. Hu and P. Anderson (2010). "Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly." *J Biol Chem* 285(14): 10959-10968.
- Ender, C., A. Krek, M. R. Friedlander, M. Beitzinger, L. Weinmann, W. Chen, S. Pfeffer, N. Rajewsky and G. Meister (2008). "A human snoRNA with microRNA-like functions." *Mol Cell* 32(4): 519-528.
- Epting, C. L., B. M. Coates and D. M. Engman (2010). "Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." *Exp Parasitol* 126(3): 283-291.
- Eystathioy, T., E. K. Chan, S. A. Tenenbaum, J. D. Keene, K. Griffith and M. J. Fritzler (2002). "A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles." *Mol Biol Cell* 13(4): 1338-1351.
- Ferreira, L. R., M. Dossin Fde, T. C. Ramos, E. Freymuller and S. Schenkman (2008). "Active transcription and ultrastructural changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis." *An Acad Bras Cienc* 80(1): 157-166.
- Figueiredo, R. C., D. S. Rosa, Y. M. Gomes, M. Nakasawa and M. J. Soares (2004). "Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation." *Parasitology* 129(Pt 4): 431-438.
- Filipowicz, W., L. Jaskiewicz, F. A. Kolb and R. S. Pillai (2005). "Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs." *Curr Opin Struct Biol* 15(3): 331-341.
- Florencio-Martinez, L., C. Marquez-Duenas, G. Ballesteros-Rodea, S. Martinez-Calvillo and R. Manning-Cela (2010). "Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*." *Exp Parasitol* 126(3): 332-336.

- Franzen, O., E. Arner, M. Ferella, D. Nilsson, P. Respuela, P. Carninci, Y. Hayashizaki, L. Aslund, B. Andersson and C. O. Daub (2011). "The short non-coding transcriptome of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*." PLoS Negl Trop Dis 5(8): e1283.
- Frasch, A. C. (2000). "Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*." Parasitol Today 16(7): 282-286.
- Garcia-Silva, M. R., F. Cabrera-Cabrera, M. C. Güida and A. Cayota (2012). "Hints of tRNA-Derived Small RNAs Role in RNA Silencing Mechanisms." Genes 3(4): 603-614.
- Garcia-Silva, M. R., F. Cabrera-Cabrera, M. C. Güida and A. Cayota (2013). "Novel aspects of tRNA-derived small RNAs with potential impact in infectious diseases." Advances in Biochemical and Biotechnology 4(5A).
- Garcia-Silva, M. R., M. Frugier, J. P. Tosar, A. Correa-Dominguez, L. Ronalte-Alves, A. Parodi-Talice, C. Rovira, C. Robello, S. Goldenberg and A. Cayota (2010). "A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules." Mol Biochem Parasitol 171(2): 64-73.
- Garcia-Silva, M. R., M. Frugier, J. P. Tosar, A. Correa-Dominguez, L. Ronalte-Alves, A. Parodi-Talice, C. Rovira, C. Robello, S. Goldenberg and A. Cayota (2011). "A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules." Mol Biochem Parasitol 171(2): 64-73.
- Garcia Silva, M. R., J. P. Tosar, M. Frugier, S. Pantano, B. Bonilla, L. Esteban, E. Serra, C. Rovira, C. Robello and A. Cayota (2010). "Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids." Gene 466(1-2): 26-35.
- Ghildiyal, M. and P. D. Zamore (2009). "Small silencing RNAs: an expanding universe." Nat Rev Genet 10(2): 94-108.
- Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon and M. A. Carmell (2006). "A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins." Nature 442(7099): 199-202.
- Girones, N., H. Cuervo and M. Fresno (2005). "Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease." Curr Top Microbiol Immunol 296: 89-123.
- Goncalves, M. F., E. S. Umezawa, A. M. Katzin, W. de Souza, M. J. Alves, B. Zingales and W. Colli (1991). "Trypanosoma cruzi: shedding of surface antigens as membrane vesicles." Exp Parasitol 72(1): 43-53.
- Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim and D. P. Bartel (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." Mol Cell 27(1): 91-105.
- Grimson, A., M. Srivastava, B. Fahey, B. J. Woodcroft, H. R. Chiang, N. King, B. M. Degnan, D. S. Rokhsar and D. P. Bartel (2008). "Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals." Nature 455(7217): 1193-1197.
- Haiser, H. J., F. V. Karginov, G. J. Hannon and M. A. Elliot (2008). "Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium *Streptomyces coelicolor*." Nucleic Acids Res 36(3): 732-741.
- Hall, T. M. (2005). "Structure and function of argonaute proteins." Structure 13(10): 1403-1408.
- Hammond, S. M., S. Boettcher, A. A. Caudy, R. Kobayashi and G. J. Hannon (2001). "Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi." Science 293(5532): 1146-1150.

- Haussecker, D., Y. Huang, A. Lau, P. Parameswaran, A. Z. Fire and M. A. Kay (2010). "Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing." Rna 16(4): 673-695.
- Hernandez, R., A. M. Cevallos, T. Nepomuceno-Mejia and I. Lopez-Villasenor (2012). "Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis." Parasitol Res 111(2): 509-514.
- Holetz, F. B., A. Correa, A. R. Avila, C. V. Nakamura, M. A. Krieger and S. Goldenberg (2007). "Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*." Biochem Biophys Res Commun 356(4): 1062-1067.
- Horn, D. (2008). "Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids." BMC Genomics 9: 2.
- Houwing, S., L. M. Kamminga, E. Berezikov, D. Cronembold, A. Girard, H. van den Elst, D. V. Filippov, H. Blaser, E. Raz, C. B. Moens, R. H. Plasterk, G. J. Hannon, B. W. Draper and R. F. Ketting (2007). "A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish." Cell 129(1): 69-82.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists." Nucleic Acids Res 37(1): 1-13.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nat Protoc 4(1): 44-57.
- Hug, M., H. R. Hotz, C. Hartmann and C. Clayton (1994). "Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor." Mol Cell Biol 14(11): 7428-7435.
- Huttenhofer, A., M. Kiefmann, S. Meier-Ewert, J. O'Brien, H. Lehrach, J. P. Bachellerie and J. Brosius (2001). "RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse." Embo J 20(11): 2943-2953.
- Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." Nat Rev Mol Cell Biol 9(1): 22-32.
- Hwang, I. (2013). "Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response." Mol Cells.
- Inal, J. M., E. A. Ansa-Addo and S. Lange (2013). "Interplay of host-pathogen microvesicles and their role in infectious disease." Biochem Soc Trans 41(1): 258-262.
- Ivanov, P., M. M. Emara, J. Villen, S. P. Gygi and P. Anderson (2011). "Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation." Mol Cell 43(4): 613-623.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 247-269.
- Jinek, M. and J. A. Doudna (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." Nature 457(7228): 405-412.
- Jochl, C., M. Rederstorff, J. Hertel, P. F. Stadler, I. L. Hofacker, M. Schrettl, H. Haas and A. Huttenhofer (2008). "Small ncRNA transcriptome analysis from *Aspergillus fumigatus* suggests a novel mechanism for regulation of protein synthesis." Nucleic Acids Res 36(8): 2677-2689.
- Johnson, P. J., J. M. Kooter and P. Borst (1987). "Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene." Cell 51(2): 273-281.

- Jones-Rhoades, M. W., D. P. Bartel and B. Bartel (2006). "MicroRNAs and their regulatory roles in plants." Annu Rev Plant Biol 57: 19-53.
- Kawaji, H., M. Nakamura, Y. Takahashi, A. Sandelin, S. Katayama, S. Fukuda, C. O. Daub, C. Kai, J. Kawai, J. Yasuda, P. Carninci and Y. Hayashizaki (2008). "Hidden layers of human small RNAs." BMC Genomics 9: 157.
- Kenzelmann, M., K. Rippe and J. S. Mattick (2006). "RNA: Networks & Imaging." Mol Syst Biol 2: 44.
- Keyel, P. A., S. C. Watkins and L. M. Traub (2004). "Endocytic adaptor molecules reveal an endosomal population of clathrin by total internal reflection fluorescence microscopy." J Biol Chem 279(13): 13190-13204.
- Kiefer, J. C. (2006). "microRNAs under the microscope." Dev Dyn 235(3): 846-853.
- Kim, V. N. (2005). "Small RNAs: classification, biogenesis, and function." Mol Cells 19(1): 1-15.
- Kim, V. N. (2006). "Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes." Genes Dev 20(15): 1993-1997.
- Kim, V. N. and J. W. Nam (2006). "Genomics of microRNA." Trends Genet 22(3): 165-173.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science 294(5543): 853-858.
- Lee, S. R. and K. Collins (2005). "Starvation-induced cleavage of the tRNA anticodon loop in *Tetrahymena thermophila*." J Biol Chem 280(52): 42744-42749.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature 425(6956): 415-419.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo J 23(20): 4051-4060.
- Lee, Y. S., S. Pressman, A. P. Andress, K. Kim, J. L. White, J. J. Cassidy, X. Li, K. Lubell, H. Lim do, I. S. Cho, K. Nakahara, J. B. Preall, P. Bellare, E. J. Sontheimer and R. W. Carthew (2009). "Silencing by small RNAs is linked to endosomal trafficking." Nat Cell Biol 11(9): 1150-1156.
- Lee, Y. S., Y. Shibata, A. Malhotra and A. Dutta (2009). "A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs)." Genes Dev 23(22): 2639-2649.
- Leung, A. K., J. M. Calabrese and P. A. Sharp (2006). "Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules." Proc Natl Acad Sci U S A 103(48): 18125-18130.
- Levitz, R., D. Chapman, M. Amitsur, R. Green, L. Snyder and G. Kaufmann (1990). "The optional *E. coli* prr locus encodes a latent form of phage T4-induced anticodon nuclease." Embo J 9(5): 1383-1389.
- Ley, V., N. W. Andrews, E. S. Robbins and V. Nussenzweig (1988). "Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells." J Exp Med 168(2): 649-659.
- Li, Y., J. Luo, H. Zhou, J. Y. Liao, L. M. Ma, Y. Q. Chen and L. H. Qu (2008). "Stress-induced tRNA-derived RNAs: a novel class of small RNAs in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*." Nucleic Acids Res 36(19): 6048-6055.
- Li, Z., C. Ender, G. Meister, P. S. Moore, Y. Chang and B. John (2012). "Extensive terminal and asymmetric processing of small RNAs from rRNAs, snoRNAs, snRNAs, and tRNAs." Nucleic Acids Res.

- Liao, J. Y., L. M. Ma, Y. H. Guo, Y. C. Zhang, H. Zhou, P. Shao, Y. Q. Chen and L. H. Qu (2010). "Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers." PLoS One 5(5): e10563.
- Lin, H. (2007). "piRNAs in the germ line." Science 316(5823): 397.
- Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor and G. J. Hannon (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science 305(5689): 1437-1441.
- Loss-Morais, G., P. M. Waterhouse and R. Margis (2013). "Description of plant tRNA-derived RNA fragments (tRFs) associated with argonaute and identification of their putative targets." Biol Direct 8: 6.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science 303(5654): 95-98.
- Lye, L. F., K. Owens, H. Shi, S. M. Murta, A. C. Vieira, S. J. Turco, C. Tschudi, E. Ullu and S. M. Beverley (2010). "Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans." PLoS Pathog 6(10): e1001161.
- Maeda, F. Y., C. Cortez and N. Yoshida (2012). "Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion." Front Immunol 3: 361.
- Magdesian, M. H., R. Giordano, H. Ulrich, M. A. Juliano, L. Juliano, R. I. Schumacher, W. Colli and M. J. Alves (2001). "Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor." J Biol Chem 276(22): 19382-19389.
- Manque, P. A., C. M. Probst, M. C. Pereira, R. C. Rampazzo, L. S. Ozaki, D. P. Pavoni, D. T. Silva Neto, M. R. Carvalho, P. Xu, M. G. Serrano, J. M. Alves, N. Meirelles Mde, S. Goldenberg, M. A. Krieger and G. A. Buck (2011). "Trypanosoma cruzi infection induces a global host cell response in cardiomyocytes." Infect Immun 79(5): 1855-1862.
- Martens-Uzunova, E. S., M. Olvedy and G. Jenster (2013). "Beyond microRNA - Novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer." Cancer Lett.
- Masse, E., N. Majdalani and S. Gottesman (2003). "Regulatory roles for small RNAs in bacteria." Curr Opin Microbiol 6(2): 120-124.
- Mathivanan, S., H. Ji and R. J. Simpson (2010). "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." J Proteomics 73(10): 1907-1920.
- Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2006). "Non-coding RNA." Hum Mol Genet 15 Spec No 1: R17-29.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng and T. Tuschl (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Mol Cell 15(2): 185-197.
- Meister, G., M. Landthaler, L. Peters, P. Y. Chen, H. Urlaub, R. Luhrmann and T. Tuschl (2005). "Identification of novel argonaute-associated proteins." Curr Biol 15(23): 2149-2155.
- Milone, J., J. Wilusz and V. Bellofatto (2002). "Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts." Nucleic Acids Res 30(18): 4040-4050.
- Miyoshi, K., T. Miyoshi and H. Siomi (2010). "Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production." Mol Genet Genomics 284(2): 95-103.

- Molnar, A., F. Schwach, D. J. Studholme, E. C. Thuenemann and D. C. Baulcombe (2007). "miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Nature 447(7148): 1126-1129.
- Morelli, A. E., A. T. Larregina, W. J. Shufesky, M. L. Sullivan, D. B. Stolz, G. D. Papworth, A. F. Zahorchak, A. J. Logar, Z. Wang, S. C. Watkins, L. D. Faló, Jr. and A. W. Thomson (2004). "Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells." Blood 104(10): 3257-3266.
- Nardelli, S. C., A. R. Avila, A. Freund, M. C. Motta, L. Manhaes, T. C. de Jesus, S. Schenkman, S. P. Fragoso, M. A. Krieger, S. Goldenberg and B. Dallagiovanna (2007). "Small-Subunit rRNA Processome Proteins Are Translationally Regulated during Differentiation of *Trypanosoma cruzi*." Eukaryot Cell 6(2): 337-345.
- Nawrot, B., E. Sochacka and M. Duchler (2011). "tRNA structural and functional changes induced by oxidative stress." Cell Mol Life Sci 68(24): 4023-4032.
- Nelson, P., M. Kiriakidou, A. Sharma, E. Maniataki and Z. Mourelatos (2003). "The microRNA world: small is mighty." Trends Biochem Sci 28(10): 534-540.
- Ogawa, T., K. Tomita, T. Ueda, K. Watanabe, T. Uozumi and H. Masaki (1999). "A cytotoxic ribonuclease targeting specific transfer RNA anticodons." Science 283(5410): 2097-2100.
- Palenchar, J. B. and V. Bellofatto (2006). "Gene transcription in trypanosomes." Mol Biochem Parasitol 146(2): 135-141.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA." Nature 408(6808): 86-89.
- Pays, E., H. Coquelet, A. Pays, P. Tebabi and M. Steinert (1989). "Trypanosoma brucei: posttranscriptional control of the variable surface glycoprotein gene expression site." Mol Cell Biol 9(9): 4018-4021.
- Pederson, T. (2010). "Regulatory RNAs derived from transfer RNA?" Rna 16(10): 1865-1869.
- Peters, L. and G. Meister (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." Mol Cell 26(5): 611-623.
- Pfeffer, S., M. Lagos-Quintana and T. Tuschl (2003). Cloning of small RNA molecules. Current Protocols in Molecular Biology. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston et al. New York, Wiley and Sons: 26.24.21–26.24.16.
- Pham, J. W., J. L. Pellino, Y. S. Lee, R. W. Carthew and E. J. Sontheimer (2004). "A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*." Cell 117(1): 83-94.
- Pillai, R. S. (2005). "MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?" Rna 11(12): 1753-1761.
- Plath, K., S. Mlynarczyk-Evans, D. A. Nusinow and B. Panning (2002). "Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation." Annu Rev Genet 36: 233-278.
- Porto-Carreiro, I., M. Attias, K. Miranda, W. De Souza and N. Cunha-e-Silva (2000). "Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes." Eur J Cell Biol 79(11): 858-869.

- Qi, L., X. Li, S. Zhang and D. An (2006). "Genetic regulation by non-coding RNAs." Sci China C Life Sci 49(3): 201-217.
- Raiborg, C., K. G. Bache, A. Mehlum, E. Stang and H. Stenmark (2001). "Hrs recruits clathrin to early endosomes." EMBO J 20(17): 5008-5021.
- Reifur, L., M. R. Garcia-Silva, S. B. Poubel, L. R. Alves, P. Arauco, D. K. Buiar, S. Goldenberg, A. Cayota and B. Dallagiovanna (2012). "Distinct subcellular localization of tRNA-derived fragments in the infective metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz 107(6): 816-819.
- Reinhart, B. J., E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, B. Bartel and D. P. Bartel (2002). "MicroRNAs in plants." Genes Dev 16(13): 1616-1626.
- Rice, D. S., G. M. Northcutt and C. Kurschner (2001). "The Lnx family proteins function as molecular scaffolds for Numb family proteins." Mol Cell Neurosci 18(5): 525-540.
- Robinson, K. A. and S. M. Beverley (2003). "Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol 128(2): 217-228.
- Ruiz, R. C., S. Favoreto, Jr., M. L. Dorta, M. E. Oshiro, A. T. Ferreira, P. M. Manque and N. Yoshida (1998). "Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signalling activity." Biochem J 330 ( Pt 1): 505-511.
- Rynes, J., C. D. Donohoe, P. Frommolt, S. Brodesser, M. Jindra and M. Uhlirova (2012). "Activating transcription factor 3 regulates immune and metabolic homeostasis." Mol Cell Biol 32(19): 3949-3962.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones and A. J. Enright (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A 104(45): 17719-17724.
- Saito, K., K. M. Nishida, T. Mori, Y. Kawamura, K. Miyoshi, T. Nagami, H. Siomi and M. C. Siomi (2006). "Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome." Genes Dev 20(16): 2214-2222.
- Schaefer, M., T. Pollex, K. Hanna, F. Tuorto, M. Meusburger, M. Helm and F. Lyko (2010). "RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage." Genes Dev 24(15): 1590-1595.
- Schmunis, G. A., A. Szarfman, W. De Souza and T. Langembach (1980). "*Trypanosoma cruzi*: antibody-induced mobility of surface antigens." Exp Parasitol 50(1): 90-102.
- Sheth, U. and R. Parker (2003). "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies." Science 300(5620): 805-808.
- Shi, H., A. Djikeng, C. Tschudi and E. Ullu (2004). "Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance." Mol Cell Biol 24(1): 420-427.
- Shi, H., E. Ullu and C. Tschudi (2004). "Function of the Trypanosome Argonaute 1 protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and arginine 735 in the Piwi domain." J Biol Chem 279(48): 49889-49893.
- Sleutels, F., R. Zwart and D. P. Barlow (2002). "The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes." Nature 415(6873): 810-813.
- Soares, M. J. (1999). "The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis." Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 139-141.

- Sobala, A. and G. Hutvagner (2011). "Transfer RNA-derived fragments: origins, processing, and functions." Wiley Interdiscip Rev RNA 2(6): 853-862.
- Sontheimer, E. J. and R. W. Carthew (2004). "Molecular biology. Argonaute journeys into the heart of RISC." Science 305(5689): 1409-1410.
- Souto-Padron, T., O. E. Campetella, J. J. Cazzulo and W. de Souza (1990). "Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction." J Cell Sci 96 ( Pt 3): 485-490.
- Sunkar, R. and J. K. Zhu (2004). "Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*." Plant Cell 16(8): 2001-2019.
- Takahashi, M., R. A. Elbarbary, M. Abe, M. Sato, T. Yoshida, Y. Yamada, M. Tamura and M. Nashimoto (2012). "Elimination of specific miRNAs by naked 14-nt sgRNAs." PLoS One 7(6): e38496.
- Tamura, M., C. Nashimoto, N. Miyake, Y. Daikuhara, K. Ochi and M. Nashimoto (2003). "Intracellular mRNA cleavage by 3' tRNase under the direction of 2'-O-methyl RNA heptamers." Nucleic Acids Res 31(15): 4354-4360.
- Tanowitz, H., M. Wittner, Y. Kress and B. Bloom (1975). "Studies of in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*. I. Ultrastructural studies on the invasion of macrophages and L-cells." Am J Trop Med Hyg 24(1): 25-33.
- Teixeira, D., U. Sheth, M. A. Valencia-Sanchez, M. Brengues and R. Parker (2005). "Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs." RNA 11(4): 371-382.
- Thompson, D. M., C. Lu, P. J. Green and R. Parker (2008). "tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes." RNA 14(10): 2095-2103.
- Thompson, D. M. and R. Parker (2009). "Stressing out over tRNA cleavage." Cell 138(2): 215-219.
- Thompson, M. R., D. Xu and B. R. Williams (2009). "ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer." J Mol Med (Berl) 87(11): 1053-1060.
- Tomari, Y. and P. D. Zamore (2005). "Perspective: machines for RNAi." Genes Dev 19(5): 517-529.
- Tomita, K., T. Ogawa, T. Uozumi, K. Watanabe and H. Masaki (2000). "A cytotoxic ribonuclease which specifically cleaves four isoaccepting arginine tRNAs at their anticodon loops." Proc Natl Acad Sci U S A 97(15): 8278-8283.
- Torrecilhas, A. C., R. I. Schumacher, M. J. Alves and W. Colli (2012). "Vesicles as carriers of virulence factors in parasitic protozoan diseases." Microbes Infect 14(15): 1465-1474.
- Tribulatti, M. V., J. Mucci, N. Van Rooijen, M. S. Leguizamon and O. Campetella (2005). "The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' disease by reducing the platelet sialic acid contents." Infect Immun 73(1): 201-207.
- Trocoli Torrecilhas, A. C., R. R. Tonelli, W. R. Pavanelli, J. S. da Silva, R. I. Schumacher, W. de Souza, E. S. NC, I. de Almeida Abrahamsohn, W. Colli and M. J. Manso Alves (2009). "*Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response." Microbes Infect 11(1): 29-39.
- Tschudi, C. and E. Ullu (1988). "Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes." Embo J 7(2): 455-463.
- Tuck, A. C. and D. Tollervey (2011). "RNA in pieces." Trends Genet 27(10): 422-432.
- Turchinovich, A., L. Weiz and B. Burwinkel (2012). "Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function." Trends Biochem Sci 37(11): 460-465.

- Tyler, K. M. and D. M. Engman (2001). "The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited." Int J Parasitol 31(5-6): 472-481.
- Ullu, E., K. R. Matthews and C. Tschudi (1993). "Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts." Mol Cell Biol 13(1): 720-725.
- Ullu, E., C. Tschudi and T. Chakraborty (2004). "RNA interference in protozoan parasites." Cell Microbiol 6(6): 509-519.
- Ungewickell, E. J. and L. Hinrichsen (2007). "Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding." Curr Opin Cell Biol 19(4): 417-425.
- Vagin, V. V., A. Sigova, C. Li, H. Seitz, V. Gvozdev and P. D. Zamore (2006). "A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline." Science 313(5785): 320-324.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol 9(6): 654-659.
- Vasudevan, S. (2012). "Posttranscriptional upregulation by microRNAs." Wiley Interdiscip Rev RNA 3(3): 311-330.
- Vickers, K. C., B. T. Palmisano, B. M. Shoucri, R. D. Shamburek and A. T. Remaley (2011). "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." Nat Cell Biol 13(4): 423-433.
- Vijayarathay, S., I. Ernest, J. E. Itzhaki, D. Sherman, M. R. Mowatt, P. A. Michels and C. E. Clayton (1990). "The genes encoding fructose biphosphate aldolase in *Trypanosoma brucei* are interspersed with unrelated genes." Nucleic Acids Res 18(10): 2967-2975.
- Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris and C. M. Croce (2006). "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." Proc Natl Acad Sci U S A 103(7): 2257-2261.
- Wadelin, F., J. Fulton, P. A. McEwan, K. A. Spriggs, J. Emsley and D. M. Heery (2010). "Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia." Mol Cancer 9: 226.
- Wang, K., S. Zhang, J. Weber, D. Baxter and D. J. Galas (2010). "Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells." Nucleic Acids Res 38(20): 7248-7259.
- Wassenegger, M. and G. Krczal (2006). "Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases." Trends Plant Sci 11(3): 142-151.
- Wei, H., B. Zhou, F. Zhang, Y. Tu, Y. Hu, B. Zhang and Q. Zhai (2013). "Profiling and identification of small rDNA-derived RNAs and their potential biological functions." PLoS One 8(2): e56842.
- Wright, F. A., W. J. Lemon, W. D. Zhao, R. Sears, D. Zhuo, J. P. Wang, H. Y. Yang, T. Baer, D. Stredney, J. Spitzner, A. Stutz, R. Krahe and B. Yuan (2001). "A draft annotation and overview of the human genome." Genome Biol 2(7): RESEARCH0025.
- Yamasaki, S., P. Ivanov, G. F. Hu and P. Anderson (2009). "Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression." J Cell Biol 185(1): 35-42.
- Yeung, M. L., Y. Bennasser, K. Watashi, S. Y. Le, L. Houzet and K. T. Jeang (2009). "Pyrosequencing of small non-coding RNAs in HIV-1 infected cells: evidence for the

- processing of a viral-cellular double-stranded RNA hybrid." Nucleic Acids Res 37(19): 6575-6586.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev 17(24): 3011-3016.
- Yigit, E., P. J. Batista, Y. Bei, K. M. Pang, C. C. Chen, N. H. Tolia, L. Joshua-Tor, S. Mitani, M. J. Simard and C. C. Mello (2006). "Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi." Cell 127(4): 747-757.
- Yuan, G., C. Klambt, J. P. Bachellerie, J. Brosius and A. Huttenhofer (2003). "RNomics in *Drosophila melanogaster*: identification of 66 candidates for novel non-messenger RNAs." Nucleic Acids Res 31(10): 2495-2507.
- Zamore, P. D. and B. Haley (2005). "Ribo-gnome: the big world of small RNAs." Science 309(5740): 1519-1524.
- Zhang, H., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof and W. Filipowicz (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell 118(1): 57-68.
- Zhang, S., L. Sun and F. Kragler (2009). "The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation." Plant Physiol 150(1): 378-387.
- Zhou, X., J. Ruan, G. Wang and W. Zhang (2007). "Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species." PLoS Comput Biol 3(3): e37.
- Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc and A. G. Schijman (2009). "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Mem Inst Oswaldo Cruz 104(7): 1051-1054.