

Análisis de los mecanismos de regulación de la expresión génica en el ciclo proliferativo de *Trypanosoma cruzi*.

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas del PEDECIBA
Subárea – Biología Celular y Molecular

Mag. Santiago Chávez García

Sección Genómica Funcional – Facultad de Ciencias
Departamento de Genética – Facultad de Medicina
Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Dra. María Ana Duhagon - Directora
Dr. José Roberto Sotelo-Silveira - Co-director

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 - Trypanosoma cruzi y la enfermedad de Chagas.....	4
1.2 - Biología molecular y aproximaciones genómicas en tripanosomátidos.	13
1.3 – El ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	24
OBJETIVOS	33
2.1 – Objetivo general.....	33
2.2 – Objetivos específicos.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
3.1. Cultivo de parásitos.	34
3.2. Sincronización y análisis de citometría de flujo.....	34
3.3. Preparación de muestras para <i>ribosome profiling</i> (Ribo-Seq).	35
3.4. Procesamiento de lecturas de secuencias, mapeo y expresión génica diferencial.....	37
3.5. Preparación de muestras para análisis proteómico.....	38
3.6. Análisis de los datos proteómicos.	40
3.7. Análisis de agrupamiento de genes co-expresados.	41
3.8. Identificación de motivos de secuencia lineal en regiones UTR.....	42
3.9. Manipulación de ácidos nucleicos para el clonado en el vector reportero.....	43
3.10. Transfección por electroporación en cultivos de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	46
3.11. Detección de actividad Luciferasa del vector reportero.	46
RESULTADOS	48
4 – Análisis multiómico de la transición proliferativa G1/S.....	48
4.1 – Remodelación traduccional y proteómica en la transición G1/S del ciclo celular de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	48
4.2 - Comparación de los cambios transcriptómicos, traductómicos y proteómicos en la transición G1/S del ciclo celular de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	54
4.3 - Genes y procesos biológicos regulados diferencialmente en el traductoma y el proteoma durante la transición del ciclo celular del epimastigote G1/S de <i>T. cruzi</i>	62
4.4 - Análisis de los perfiles de expresión en <i>T. cruzi</i> de los genes candidatos a actuar como reguladores del ciclo celular.....	66
5 – Identificación de posibles regulones en el ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	71
5.1 - Identificación de conjuntos de genes postranscripcionales co-expresados en la transición del ciclo celular del epimastigote G1/S de <i>T. cruzi</i>	71
5.2 - Identificación de motivos de secuencia lineal compartidos en grupos de genes co-regulados.	75
5.3 – Caracterización y evaluación del motivo uUAGAUu detectado en genes de alta traducción en fase S.....	78
DISCUSIÓN	87
PERSPECTIVAS.....	98
Estudiar de cambios observados en ciclo celular no perturbado y en estadio amastigota	98
Caracterización de regulones postranscripcionales en el ciclo celular	100
REFERENCIAS.....	102

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un antiguo protozoo parásito que causa la enfermedad de Chagas, la parasitosis de mayor carga en latinoamérica, donde afecta a más de 6 millones de personas. Los fármacos antiparasitarios empleados para tratar la enfermedad tienen una baja eficacia y provocan graves reacciones adversas, por lo tanto, se necesita avanzar en la comprensión de la biología del parásito para poder diseñar mejores tratamientos. El control del inicio transcripcional es central en la replicación de las células eucariotas, sin embargo, los tripanosomátidos prácticamente no regulan la expresión génica a ese nivel. De esta forma, tienen una mayor dependencia en los mecanismos de control post-transcripcionales que las células del hospedero, lo que los coloca como un punto interesante para diseñar terapias específicas contra el parásito. En esta tesis estudiamos la regulación postranscripcional durante la transición proliferativa G1/S de *T. cruzi*, un punto crucial para inhibir la replicación del parásito. Aplicamos aproximaciones de *Ribosome Profiling* y Proteómica cuantitativa sobre cultivos de epimastigotes sincronizados con hidroxiquina. Identificamos un total de 1,784 genes con regulación traduccional (cambio > 2, y FDR < 0.05) y 653 proteínas diferencialmente expresadas (cambio > 1.5, FDR < 0.05). Observamos una importante remodelación traduccional acompañada de un extenso cambio en el proteoma, mientras que el transcriptoma muestra cambios de menor magnitud. Los genes diferencialmente expresados están involucrados en procesos específicos del ciclo celular, confirmando datos previos. Al mismo tiempo revelamos candidatos reguladores del ciclo celular novedosos, que experimentan regulación traduccional no constatado previamente para la mayoría de estos genes. Hemos generado un comprensivo grupo de datos en tres niveles de expresión génica, una comparación que no se había realizado antes en tripanosomátidos, e incluso, no es frecuente en la literatura. Nuestro estudio revela por primera vez, que *T. cruzi* ejerce una regulación traduccional superior a la de otros eucariotas como levadura y hombre en un proceso biológico, en este caso la transición G1/S, lo que afecta a reguladores clave del ciclo. Si bien esto era algo esperado, no se había descrito para un proceso biológico generalmente conservado en los eucariotas. Además, identificamos grupos de genes co-expresados a niveles específicos, que podrían constituir regulones postranscripcionales a ser estudiados. En particular, identificamos un motivo de secuencia lineal (uUAGAUu) en las regiones 3'-UTR de un grupo de 361 genes que podría participar en el control de la traducción periódica de estos transcritos. Finalmente, los datos generados están disponibles para la comunidad para utilizar como referencia, así como profundizar el análisis en enfoques de biología de sistemas.

INTRODUCCIÓN

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

Los tripanosomátidos, orden *Trypanosomatida*, son protozoarios flagelados antiguos, es decir, con una muy temprana emergencia en el árbol filogenético eucariota. Hoy día se clasifican dentro del supergrupo de los Discoba, ya que el grupo al que pertenecían previamente, los Excavados, se disolvió recientemente al comprobarse que no tienen soporte como clado monofilético (Adl et al., 2019; Keeling and Burki, 2019). Los tripanosomátidos forman parte de la clase *Kinetoplastea*, denominación proveniente de la particular arquitectura del genoma de la única mitocondria que presentan estos organismos unicelulares. El genoma mitocondrial entonces conforma una estructura conocida como kinetoplasto, la cual es definida por algunos autores como “el más complejo e inusual ADN mitocondrial presente en la naturaleza” (Cavalcanti and de Souza, 2018). El kinetoplasto está compuesto por un entramado de miles de moléculas de ADN circular concatenadas que forman una intrincada red topológica.

A pesar de que los miembros de la familia *Trypanosomatidae* son parásitos que generalmente infectan insectos únicamente, algunos miembros de ciertos géneros particulares de la familia presentan ciclos de vida más complejos, que frecuentemente involucran un segundo hospedero mamífero. Aquí es donde se describen varias especies de tripanosomátidos que causan enfermedades infecciosas con efectos devastadores en regiones tropicales y subtropicales, donde los insectos que actúan como vectores para transmitir estas parasitosis son endémicos (Stuart et al., 2008). Más específicamente, varias leishmaniasis (causadas por especies del género *Leishmania*), junto a la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana (causada por *Trypanosoma brucei*) y la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana

(causada por *Trypanosoma cruzi*) conforman las tres parasitosis mayores causadas por tripanosomátidos, las cuales afectan a decenas de millones de personas a nivel mundial (Burza et al., 2018; Büscher et al., 2017; Pérez-Molina and Molina, 2018). Muy frecuentemente, los tripanosomátidos exponen complejos ciclos de vida que pueden involucrar múltiples de vectores y también variados hospederos vertebrados, generalmente mamíferos, que actúan como reservorios y llevan a que estas parasitosis comprendas complejas zoonosis que dificultan aún más su control (Barrett et al., 2003; Giordani et al., 2016). En el caso de *T. cruzi* se han descrito más de 100 especies, tanto de insectos vectores, como de hospederos mamíferos, donde se incluyen tanto a animales salvajes como a domésticos, además del ser humano (Coura and Viñas, 2010).

Nos centraremos ahora en la tripanosomiasis americana, que es conocida como enfermedad de Chagas como reconocimiento al rol central que tuvo el investigador Carlos Chagas al describir tanto la patología en sí, como también identificar a *T. cruzi* como agente etiológico y a los insectos triatominos (de la subfamilia *Triatominae*) como vectores responsables de la transmisión (Chagas, 1909). Esta parasitosis se encuentra distribuida en regiones rurales tropicales y subtropicales de América Latina, desde el Sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina. Sabemos que la misma nos acompaña a los humanos desde hace muchos años, ya que la evidencia más antigua proviene de la detección de ADN parasitario en una momia de 9.000 años de antigüedad encontrada en la costa de la región de Atacama en Chile (Aufderheide et al., 2004). Se cree que en ese entonces el individuo afectado participaba de un ciclo más bien selvático de transmisión de *T. cruzi*. Sin embargo, más adelante en el tiempo, con la deforestación y el avance de los establecimientos humanos en la región, se piensa que emergió un ciclo más bien doméstico, con una interacción más cercana con a los insectos vectores que colonizaron las viviendas rurales e incorporaron a los humanos y los animales domésticos como fuentes de

alimentación, estableciéndose la zoonosis que hoy día involucra a la enfermedad de Chagas (Coura, 2007). La tripanosomiasis americana afecta mayoritariamente a poblaciones vulnerables de bajos recursos económicos que habitan en estas regiones y están expuestas a la transmisión vectorial. Esto lleva a que exista un bajo interés de la industria farmacéutica en invertir para el desarrollo de tratamientos más efectivos para combatir esta parasitosis. Así, la enfermedad de Chagas es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad tropical desatendida (NTD, de *neglected tropical disease*), junto a las otras patologías causadas por tripanosomátidos (Molyneux, 2014; WHO, 2023a). En el último reporte de la OMS se estima que existen más de 6 millones de individuos infectados por la enfermedad de Chagas a nivel mundial, aunque solo el 30% estarían diagnosticados (WHO, 2023b). Asimismo, se registran en el entorno de 30.000 casos nuevos y 12.000 fallecimientos anualmente y se estima que 75 millones de personas están en riesgo de contraer la infección. Esto último es debido a que existen otras formas de transmisión más allá de la vectorial ya comentada. Estas comprenden la transmisión vertical de madres infectadas a sus hijos durante el embarazo o el parto, la transmisión por transfusiones de sangre o productos sanguíneos no controlados y la transmisión oral, por consumir productos contaminados con heces de insectos triatominos o heces de mamíferos infectados (Shikanai-Yasuda and Carvalho, 2012). Por otro lado, a pesar de que la prevalencia mayor de la parasitosis ocurre en latinoamérica, se ha reportado un relevante número de casos fuera de las regiones endémicas dado el flujo de inmigrantes, donde Estados Unidos, Canadá, Japón, Australia y varios países de Europa Occidental son ejemplos notorios (Figura 1.1) (Lidani et al., 2019).

Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018

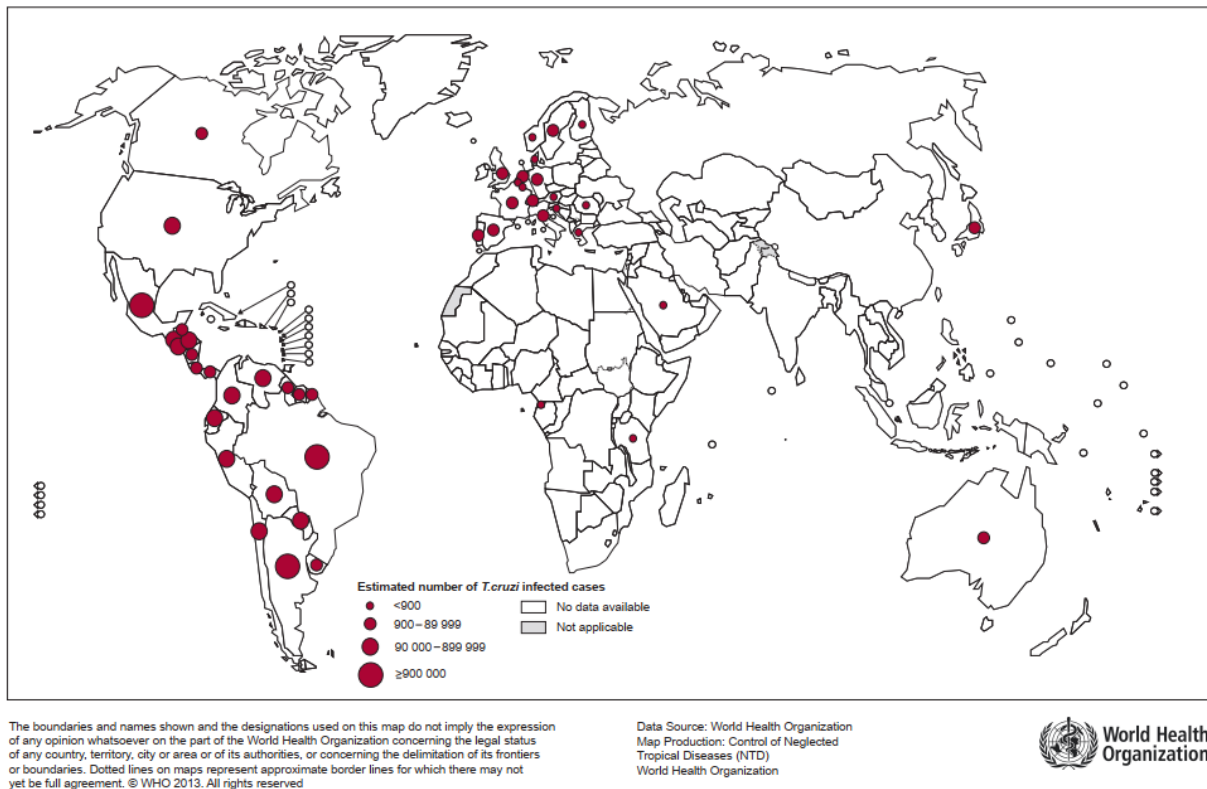


Figura 1.1 Distribución global de la enfermedad de Chagas. Número de casos tomado de estimaciones de la OMS entre 2006-2015, con su última actualización en 2018.

Respecto al desarrollo de la enfermedad de Chagas, esta suele desencadenar una etapa aguda en las primeras semanas luego de la infección con *T. cruzi*. Aquí es característico observar altas parasitemias en sangre, pero síntomas poco específicos y de intensidad variable, pudiendo incluir fatiga, fiebre, vómitos y diarrea, entre otros. Esta etapa inicial puede llegar a ser fatal en niños dependiendo de su estado previo, sin embargo, suele presentarse de forma mayoritariamente asintomática en adultos en buenas condiciones de salud (Pérez-Molina and Molina, 2018). Luego de este período de infección aguda, la enfermedad pasa a una etapa indeterminada, donde el parásito coloniza tejidos específicos en los que se puede alojar en un estado quiescente mostrando muy bajas parasitemias en sangre. Luego, muy lentamente, la patología avanza hacia una etapa crónica, donde un 30% de los casos desarrolla graves cardiopatías y mega formaciones digestivas que pueden dar lugar a falla cardíaca y a la muerte

súbita del paciente (Echavarría et al., 2021). Vale en este punto aclarar que, a pesar de que la enfermedad de Chagas no presenta una alta tasa de mortalidad, la misma causa más muertes anuales en Latinoamérica que cualquier otra enfermedad parasitaria. Más aún, representa la parasitosis de mayor carga a nivel mundial dada su alta morbilidad, la cual recientemente se estimó en 806,170 DALYs anuales a nivel global (del inglés *Disability-Adjusted Life Years*), lo que representa el número de años perdidos debido a la mala salud, discapacidad o muerte prematura con respecto a la esperanza de vida sin la enfermedad (Bonney, 2014; Lee et al., 2013). Más aún, el costo económico global de la enfermedad de Chagas se estimó en 7.2 billones de dólares americanos al año.

En la actualidad, el tratamiento de la enfermedad de Chagas solo cuentan con dos fármacos aprobados para uso en humanos: el Benznidazol (Roche) y el Nifurtimox (Bayer), ambos diseñados hace más de medio siglo (Apt, 2010; Nunes et al., 2013). Los mecanismos de acción de estos fármacos no están del todo claros, pero si está establecido que ambos son profármacos que son activados específicamente por la nitroreductasa mitocondrial y solo así se da lugar al efecto tripanocida (Wilkinson et al., 2008). Ambos fármacos muestran eficacia solamente al ser administrados muy tempranamente en la fase aguda, o en casos de transmisión congénita o de reactivación debido a inmunosupresión. Sin embargo, el tratamiento es muy frecuentemente discontinuado debido a su larga duración y la severidad de sus efectos adversos. Ahora, para tratar la etapa crónica, que constituye desafortunadamente la presentación más frecuente de la parasitosis, ambos fármacos han mostrado una eficacia reducida y variable dependiendo de diversos factores, tales como la cepa de *T. cruzi* (Toledo et al., 2004), las comorbilidades, la edad del paciente, el tiempo que estuvo infectado, entre otros. En la actualidad no hay consensos sobre la utilidad del tratamiento con estos fármacos, dado que a pesar de la capacidad de prevenir el desarrollo de la enfermedad en ciertos casos (Bern et al., 2007), también se ha visto que pacientes con cardiopatías severas no presentan ningún retraso en el desarrollo

clínico de la enfermedad frente al tratamiento (Marin-Neto et al., 2008). Al mismo tiempo, por más que los esfuerzos no han sido escasos, todavía se está lejos de contar con una vacuna profiláctica eficiente (Camargo et al., 2022). Los expertos en el campo apuntan a una multiplicidad de factores que limitan los avances en este campo, desde el poco interés de las compañías farmacéuticas ya que dada la población objetivo no resulta en una inversión redituable, hasta el lento desarrollo de la enfermedad que hace muy difícil pensar en ensayos clínicos que den resultados en plazos razonables. En este complejo escenario, la búsqueda de alternativas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad sigue siendo un tema prioritario en la comunidad de investigadores dedicados al trabajo en torno a la enfermedad de Chagas (Giordani et al., 2016).

Trypanosoma cruzi exhibe un ciclo de vida complejo donde se alternan diversos estadios del desarrollo morfológica y biológicamente muy diferentes. Estos estadios se desarrollan en diversos ambientes y momentos durante la infección en el hospedero mamífero y también en el vector triatomino hematófago (Figura 1.2)(Stuart et al., 2008). En total, a lo largo del ciclo de vida, el parásito transita por cuatro estadios diferentes (Tyler and Engman, 2001; Zuma et al., 2021). En el vector se desarrollan los epimastigotas, que son un estadio replicativo no-infectivo que prolifera en el aparato digestivo del insecto, y los tripomastigotas metacíclicos que se forman al alcanzar el recto y son parásitos quiescentes e infectivos adaptados para sobrevivir la transición al hospedero mamífero. Por otro lado, en el hospedero mamífero se identifica la forma amastigota que replica en el citosol de las células infectadas, y los tripomastigotas sanguíneos, que son quiescentes y son capaces de infectar nuevas células al ser liberados al torrente sanguíneo (ver figura 1.2 para más detalles).

Volviendo brevemente a la taxonomía de *T. cruzi*, como tripanosomátido de la familia *Trypanosomatidae*, el mismo comparte una serie de características muy particulares de este grupo de organismos que los ha posicionado como organismos modelo para el estudio de los eucariotas (De Souza, 2002). En primer lugar, como se mencionó previamente, cuentan con una única mitocondria de gran tamaño, que se extiende por todo el citoplasma del parásito. El ADN mitocondrial, o kinetoplasto, representa aproximadamente un 25% del ADN celular y este se puede observar como un disco ligeramente cóncavo electrón-denso en una imagen de microscopía electrónica. Este complejo genoma mitocondrial consiste en un entramado de moléculas de ADN circular concatenadas de dos tipos: los maxicírculos y los minicírculos (Simpson, 1973). Los maxicírculos generalmente tienen entre 35 y 50 kb de extensión y codifican para los genes mitocondriales tradicionales, como los ARNs ribosomales y las proteínas de la cadena respiratoria, y se ha visto que están conservados en diferentes cepas de *T. cruzi* (Berná et al., 2021). Los minicírculos son más pequeños, de aproximadamente 1 kb de largo, y codifican para ARNs pequeños no codificantes (ARN guías) que tienen un rol principal en el procesamiento de los transcritos mitocondriales (Aphasizhev and Aphasizheva, 2011). Este proceso particular del procesamiento de los ARNm fue descrito por primera vez en los tripanosomátidos y se conoce como editing del ARNm (Benne et al., 1986). Brevemente, los transcritos primarios de ARNm mitocondriales son editados por la adición/eliminación de residuos de uridina de forma específica. Los sitios para incorporar las modificaciones son determinados por los ARN guías que interaccionan por hibridación con esa región. Este proceso es fundamental para asegurar la correcta traducción de los genes mitocondriales, incluyendo eventos donde se genera el marco de lectura correcto, y demostró ser un proceso ampliamente descrito en los eucariotas modernos también (Gray, 2012).

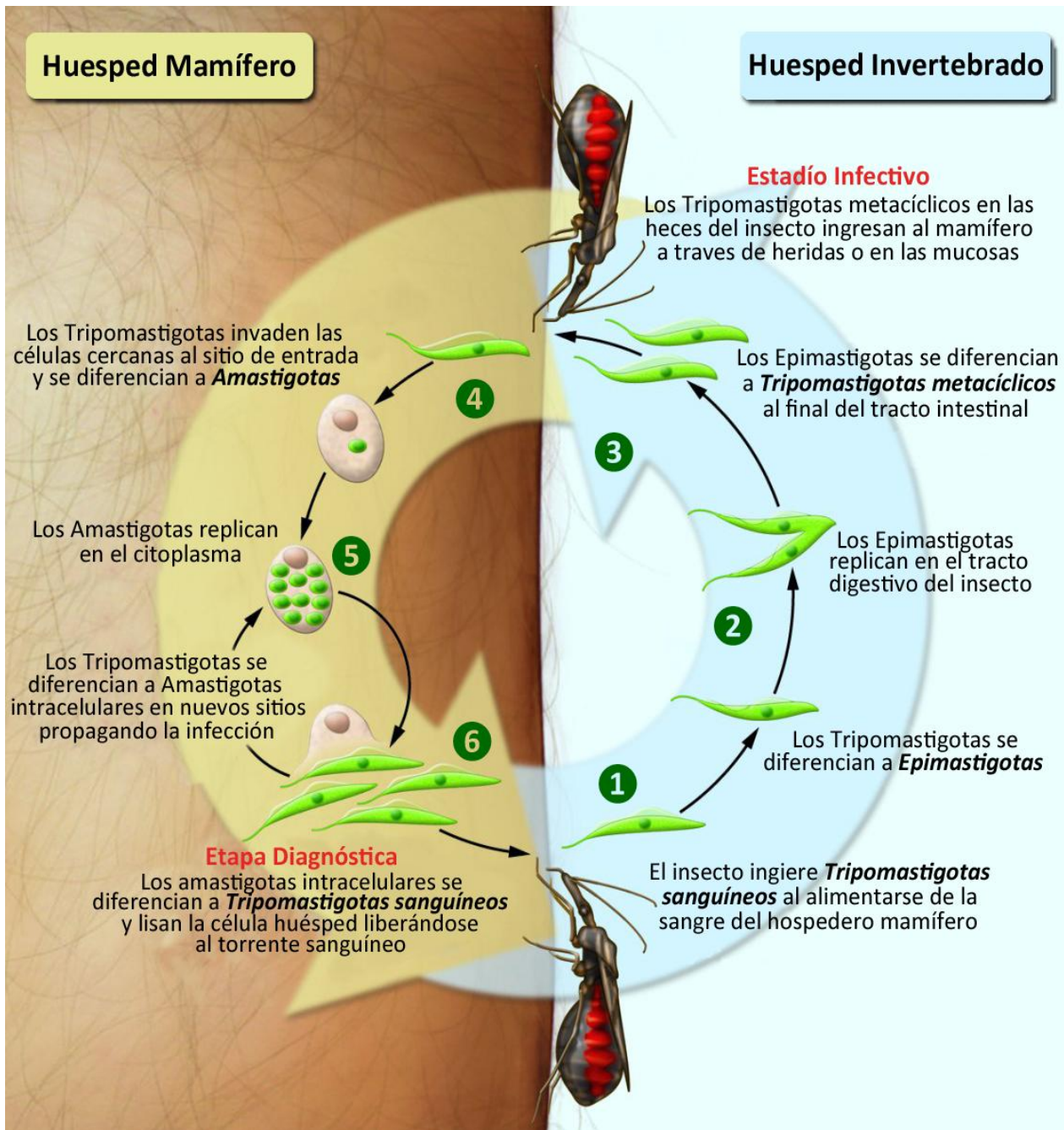


Figura 1.2 Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*. 1) El ciclo inicia cuando un insecto triatómino se alimenta de la sangre de un individuo afectado e incorpora a su tracto digestivo *tripomastigotas sanguíneos*. 2) Estos *tripomastigotas* se diferencian a la forma *epimastigota* y proliferan en el tracto medio del intestino. 3) Al alcanzar el recto, los *epimastigotas* diferencian a *tripomastigotas metacíclicos*, los cuales son depositados con las heces del insecto y son capaces de ingresar a un nuevo individuo a través de heridas o por las superficies mucosas. 4) Los *tripomastigotas* infectan a las células ubicadas en la cercanía del sitio de picadura y se diferencian a *amastigotas* en el citoplasma. 5) Los *amastigotas* son replicativos y proliferan en el ambiente intracelular. 6) Los *amastigotas* se diferencian a *tripomastigotas sanguíneos* y son liberados al medio extracelular interno cuando la célula hospedera se lisa. Una vez en el sistema circulatorio, los *tripomastigotas* colonizan nuevos tejidos propagando así la infección dentro del individuo afectado. El ciclo se completa cuando un insecto se alimenta de un individuo infectado y adquiere los *tripomastigotas sanguíneos*. Imagen tomada y modificada de Stuart et al., "Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases" J. Clin. Invest. (2008).

- INTRODUCCIÓN -

Otros aspectos de la biología celular muy particulares de este grupo de organismos ocurren en torno a la mitosis. En primer lugar, no se observa la condensación del ADN nuclear al nivel de cromosomas metafásicos sino que la segregación del material genético se da dentro del núcleo, ya que no ocurre la disgregación de la envoltura nuclear y el huso mitótico se ensambla dentro del núcleo (Solari, 1995). Esto lleva a que durante mucho tiempo estuvo en discusión el número total de cromosomas del complemento haploide de *T. cruzi*, para que actualmente el número más aceptado sea 41 cromosomas (Branche et al., 2006; Porcile et al., 2003). Sin embargo, se ha visto una muy alta plasticidad genómica en *T. cruzi*, observándose eventos de rearrreglos y de aneuploidías frecuentemente (Cruz-Saavedra et al., 2022).

1.2 - Biología molecular y aproximaciones genómicas en tripanosomátidos.

Transcripción y procesamiento del ARN

Como se comentó previamente, los tripanosomátidos presentan características distintivas que no se observan en los modelos eucariotas más tradicionales como hongos, plantas y animales. Entonces, el estudio de estos organismos ha provisto numerosos aportes al entendimiento de cómo diversos mecanismos celulares y moleculares eucariotas se establecieron muy tempranamente en su divergencia de los procariotas (Adl et al., 2019; Keeling and Burki, 2019). En particular, nos centraremos ahora en los referido a las particularidades que presentan en su biología molecular y la expresión génica. El parásito *T. cruzi* prolifera y se adapta a ambientes muy variados, donde debe enfrentarse a desafíos como cambios en la temperatura, disponibilidad de nutrientes, y soportar la presencia de los sistemas de defensa en el hospedero vertebrado. De esta forma, la capacidad de estos organismos de adaptarse y sobrevivir en estas situaciones diversas está íntimamente vinculada con los mecanismos de modulación de la expresión génica; algunas particularidades de los mismos se esquematizan en la Figura 1.3 (Martínez-Calvillo et al., 2010).

En primer lugar, la organización genómica de los tripanosomátidos consta de largos tractos consecutivos de genes codificantes de proteínas ubicados sobre la misma hebra del ADN. La transcripción de estos tractos genómicos a partir de un único promotor inicial da lugar a largos transcritos policistrónicos. Los promotores de estos policistrones no presentan elementos promotores canónicos para la ARN polimerasa II (Clayton, 2002). Estos tractos de múltiples genes están interrumpidos por regiones que se denominan de cambio de hebra (SSRs, de *strand switch regions*), las cuales son de 2 tipos: divergentes y convergentes. Los SSRs divergentes son

- INTRODUCCIÓN -

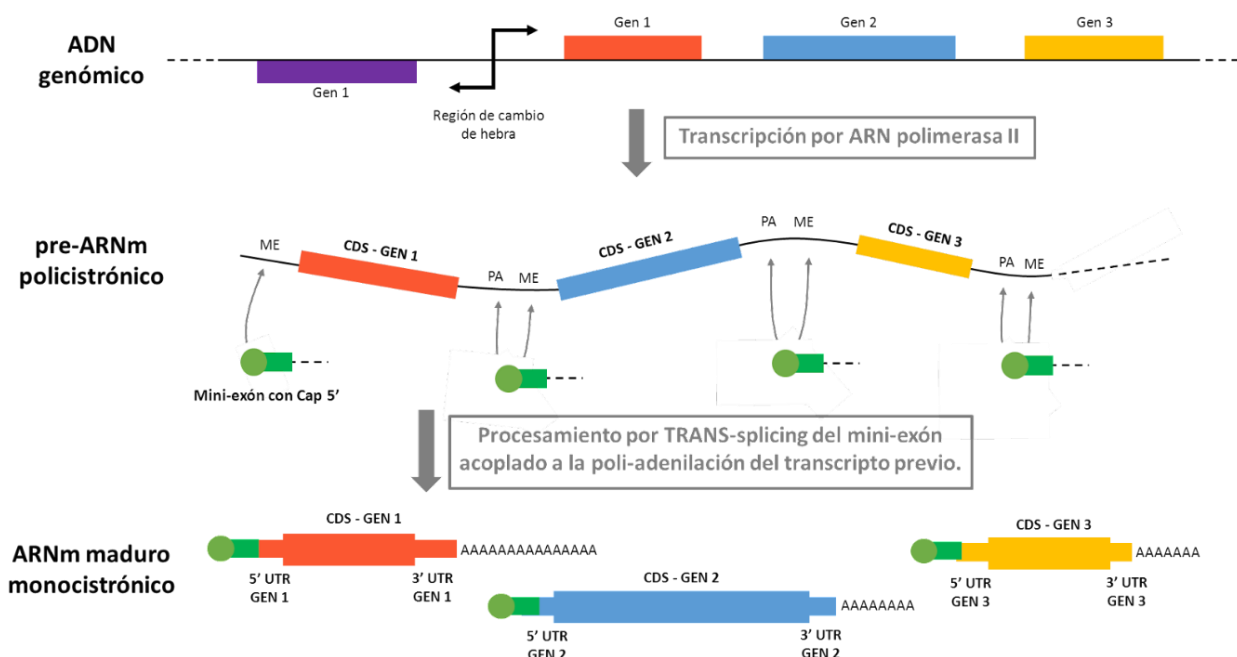


Figura 1.3 Particularidades de la expresión génica de los tripanosomátidos. Se esquematiza una región de ADN genómico de y cómo actúan en la misma la transcripción y el posterior procesamiento de los transcritos primarios. En otra región genómica se expresa el ARN codificante para el mini-exón, que también es transcrito por la ARN polimerasa. ME: mini-exón, PA: señal de poliadenilación, CDS: secuencia codificante, UTR: región no traducida, CAP: caperuza.

aquellos que están codificados en hebras diferentes, inician en una misma región y están orientados en direcciones opuestas (Martínez-Calvillo et al., 2003). Allí se describen los sitios de inicio de la transcripción (TSSs, de *transcription start sites*), donde se observa la acumulación de variantes y modificaciones de histonas, así como de señales de curvatura particulares (Respuela et al., 2008; Smircich et al., 2017). Por otro lado los SRRs convergentes, son aquellos donde se encuentran las colas de 2 unidades transcripcionales y aquí se identifican señales de terminación como también suelen ser frecuentes genes de ARNt transcritos por la ARN polimerasa III (Martínez-Calvillo et al., 2004; Ne et al., 2009). A pesar de que esta organización genómica asemeja a los operones de procariotas, en tripanosomátidos no se observa asociación funcional entre los genes que componen un policistrón, y suelen involucrar entre decenas y cientos de genes (Palenchar and Bellofatto, 2006). Esta particular organización genómica sugiere la

existencia de mecanismos también particulares para dar lugar a los ARNm monocistrónicos maduros típicos de los eucariotas. Un actor principal en el procesamiento de los policistrones es un transcrito corto, de aproximadamente 140 nucleótidos (dependiendo de la especie de tripanosomátido) que se conoce como mini-exón (ME) o *splice-leader* (Boothroyd and Cross, 1982). Este ARN se produce masivamente desde regiones genómicas con monocistrones dispuestos en tándem, siendo su transcripción controlada por promotores para la ARN polimerasa II, el primero de este tipo descrito para los tripanosomátidos (Gilinger and Bellofatto, 2001). Los tripanosomátidos incorporan parte de este transcripto de mini-exón a cada gen del policistrón mediante *TRANS-splicing*, el proceso de corte y empalme del ARN entre 2 moléculas diferentes, proceso que fue descubierto en estos organismos (Agabian, 1990; Sather and Agabian, 1985). Vale destacar que los genes de los tripanosomátidos no presentan intrones (salvo escasas excepciones) y por lo tanto el proceso de *CIS-splicing*, más extendido en eucariotas superiores, aquí es muy infrecuente (Mair et al., 2000). Una parte del transcripto completo del mini-exón se incorpora al extremo 5' de cada secuencia codificante del policistrón, y esto se da acoplado a la poliadenilación sobre el extremo 3' de la secuencia codificante previa, coordinando estos eventos para eliminar las secuencias intergénicas y dar como producto final ARNm monocistrónicos característicos de eucariotas (Figura 1.3)(LeBowitz et al., 1993). El mini-exón aporta la caperuza 5' a los transcriptos de ARNm monocistrónicos generados, dado que este la incorporó antes del transplicing. Esta caperuza comprende un tracto de nucleósidos modificados por metilación en el carbono 2' de la ribosa, que da lugar a la estructura conocida como "cap-4", también particular de los tripanosomátidos (Bangs et al., 1992; Perry et al., 1987). Si bien el mini-exon se transcribe como un precursor de 140 bases, el fragmento que se incorpora al 5' de los ARNm es de 38-40 bases en tripanosomátidos (De Lange et al., 1984). Las señales conservadas para dirigir a la maquinaria de *TRANS-splicing* consisten en un dinucleótido AG en el sitio 3' de splicing junto a una región cercana rica en pirimidinas (Hummel et al., 2000). Este procesamiento del extremo 5' está acoplado a la poliadenilación posterior del gen corriente

arriba en el policistrónico de modo que permite obtener los ARNm monocistrónicos maduros, que luego serán exportados al citoplasma para ser traducidos (Campos et al., 2008). Aunque aún no se conoce bien como se especifica la distancia entre el sitio de poli-adenilación y el trecho polipirimidina corriente abajo, existe una preferencia de clivaje en motivos de secuencias ricas en adeninas, y una distancia media entre estos sitios de 40 nucleótidos en *T. cruzi* (Clayton and Michaeli, 2011; Kramer, 2021).

La transcripción policistrónica controlada por promotores de expresión mayormente constitutiva indica que los tripanosomátidos dependen en gran manera de mecanismos de regulación de la expresión génica post-transcripcional para lograr expresión diferencial de sus genes (Avila et al., 2003; De Gaudenzi et al., 2011; Krieger et al., 1999). En particular, se ha visto que tanto el procesamiento del transcrito, como la exportación al citoplasma, la estabilidad o degradación diferencial, la movilización a la fracción polisomal y la accesibilidad a la maquinaria de traducción son todos eventos donde se puede regular la expresión génica de manera post-transcripcional, para los cuales *T. cruzi* presenta ejemplos donde resultan fundamentales en ciertos fenotipos o procesos celulares (Alves et al., 2015; Benabdellah et al., 2007; Inoue et al., 2014; Pérez-Díaz et al., 2013). En particular, las regiones transcriptas no traducidas (UTRs, de *Untranslated Regions*) presentan elementos que permiten la regulación de los transcritos que los portan mediante la unión a proteínas específicas conocidas como RBPs (de *RNA Binding Proteins*), que particularmente en tripanosomátidos son una familia génica muy extensa (De Gaudenzi et al., 2003). De esta forma, una de las teorías más aceptadas últimamente propone la figura de los operones post-transcripcionales como grupos de ARNm regulados en conjunto por las RBPs que interaccionan que los reconocen (De Gaudenzi et al., 2013; Ouellette and Papadopoulou, 2009).

Genoma de *Trypanosoma cruzi*

El primer borrador de genoma completo para *T. cruzi* se publicó en el 2005 (El-Sayed et al., 2005a), junto con la secuenciación de los genomas de *T. brucei* (Berriman et al., 2005) y *L. major* (Ivens et al., 2005), que constituyen los tripanosomátidos de relevancia sanitaria en humanos, conocidos en conjunto como TriTryps. Estos trabajos se publicaron como una edición especial de la revista *Science* en conjunto con un estudio comparativo entre estos tres organismos (El-Sayed et al., 2005b). En este último trabajo se reveló que los tripanosomátidos tienen un grupo central de 6200 genes compartidos entre ellos y luego presentan grandes familias génicas divergentes y específicas de cada organismo. Se vio que estas familias génicas tienen una íntima relación con las particularidades de los procesos de infección de cada parásito. Más específicamente, la secuenciación de *T. cruzi* se realizó utilizando la cepa CL Brener (del grupo TcIV), lo que implicó algunas dificultades en la etapa de ensamblado dada la naturaleza altamente repetitiva de este genoma y el hecho de que esta cepa es un híbrido resultante de 2 haplotipos parentales divergentes. Vale la pena aclarar que hoy en día se conoce que a lo largo de su distribución en latinoamérica *T. cruzi* muestra una muy amplia variabilidad genética y que las diferentes cepas se clasifican en 6 grupos conocidos como DTUs (del inglés *Discrete Typing Units*), donde el grupo I (TcI) es el más ampliamente distribuido (Zingales, 2018; Zingales et al., 2009). En este contexto, y con el objetivo de resolver el ensamblado de la cepa híbrida, se realizó una secuenciación a baja cobertura de la cepa parental más emparentada a uno de estos haplotipos, conocida como Esmeraldo (grupo TcI). Los más de 22.000 presuntos genes codificantes de proteínas identificados en el genoma de CL-Brener se clasificaron entre tipo-Esmeraldo o tipo-No Esmeraldo según la homología con las secuencias obtenidas de la cepa Esmeraldo. Sin embargo, recién algunos años más adelante se pudo mejorar estos ensamblados mediante esfuerzos dedicados a mapear las secuencias genómicas a los cromosomas de *T. cruzi* (Weatherly et al.,

2009). Aun así, dado el alto contenido de secuencias repetidas de baja complejidad, el genoma de *T. cruzi* de referencia aún era muy fragmentado, con regiones sin una buena resolución y al mismo tiempo la anotación continúa siendo la menos completa dentro de los TriTryps. Dado el acceso más universal a las tecnologías de secuenciación masiva, en los años siguientes se obtuvieron genomas para un mayor número de cepas y subespecies de *T. cruzi* lo cual permitió llevar adelante análisis comparativos y de diversidad genética (Callejas-Hernández et al., 2018; Franzén et al., 2012, 2011; Grisard et al., 2014; Reis-Cunha et al., 2018; Wang et al., 2021). Sin embargo, estos genomas resultaron altamente fragmentados, algunos incluso más que el genoma de CL-Brener, dado que fueron realizados principalmente con lecturas cortas de los secuenciadores de segunda generación. Más recientemente, debido al desarrollo de las tecnologías de secuenciación de tercera generación, capaces de generar lecturas continuas de fragmentos de ADN muy largos (de miles hasta centenas de miles de bases) se han generado genomas con una mucho mejor resolución y menor fragmentación. En particular, investigadores del grupo del Dr. Robello presentaron los genomas de 2 cepas: la híbrida TCC del DTU TcVI y la no híbrida Dm28c del DTU TcI, empleando la tecnología de PacBio SMRT (del inglés, *Single Molecular Real-Time technology*) (Berná et al., 2018). En este trabajo lograron superar los problemas principales en los genomas de *T. cruzi*: la fragmentación de los ensamblados y el colapsado resultante en subestimación de las regiones repetitivas, las cuales implican gran parte de las familias génicas implicadas en la virulencia del parásito. Con esta aproximación se logró estimar de una forma más precisa el tamaño del genoma de *T. cruzi*, determinar la ubicación y distribución de las secuencias repetitivas de baja complejidad y, por último, definir con mayor precisión los números de copias de las familias multigénicas. Este tipo de estrategia ha sido utilizada más recientemente para obtener el genoma de otra cepa híbrida, la Tulahuen del DTU TcVI, más comúnmente distribuida en países del Cono sur de Latinoamérica, pero en este caso empleando la tecnología de Oxford Nanopore Technology (ONT) (Hakim et al., 2023). A modo de resumen, a pesar de que puede haber diferencias considerables entre distintas cepas, hoy en

día se habla de que en el complemento haploide del genoma de *T. cruzi* se extiende por entre 50-60 Mb con aproximadamente un 50% de secuencias codificantes, ya sea para proteínas o para ARNs no codificantes. Gran parte de los genes codificantes para proteínas aún no tienen funciones asociadas y están anotados como proteínas hipotéticas. Ahora, respecto a los ARNs no codificantes ncRNAs (del inglés, *non-coding RNAs*), el avance de las tecnologías de secuenciación modernas también ha impulsado el descubrimiento y anotación más precisa de este tipo de moléculas (Vickers et al., 2015). En particular en los tripanosomátidos se han descrito la mayor parte de estos ARNs, incluyendo los más novedosos que son pequeños fragmentos derivados de ARNs canónicos como tRNAs, y rRNA, algunos de ellos con roles validados como reguladores de la expresión génica (Garcia-Silva et al., 2010; Kolev et al., 2019; Michaeli et al., 2012; Rajan et al., 2020). Sin embargo, este campo de investigación es un terreno fértil donde se precisa más trabajo, principalmente en la anotación de estas moléculas, que particularmente en los tripanosomátidos es aún muy poco consistente (Fort et al., 2022).

Acompasando el avance de la genómica en los últimos años se hacía necesaria la generación de herramientas y plataformas tipo base de datos especializadas para la organización de la gran cantidad de datos generados. Así es que se generó una plataforma web, bajo el nombre de EupathDB (del inglés, *eukaryotic pathogen database*), que congrega y revisa los datos genómicos de un conjunto más de 170 patógenos eucariotas, que incluye protistas y hongos, causantes de infecciones en humanos y otros mamíferos de relevancia, además de especies relevantes de vida libre (Warrenfeltz et al., 2018). Enmarcada en este proyecto se encuentra la base de datos específica para los tripanosomátidos, nombrada TritrypDB (Aslett et al., 2010), donde en su última versión se albergan datos de 87 genomas correspondientes a subespecies y cepas de un total de 36 especies de kinetoplástidos (Shanmugasundram et al., 2023). En este portal web se puede acceder a las secuencias genómicas (archivos fasta), a los archivos de anotación genética

(archivos gff) y también a una gran variedad de datos de genómica funcional que se han ido cargando en los últimos años.

Genómica Funcional

Pasando ahora a lo que serían aspectos de la genómica funcional, el primer trabajo dedicado a obtener perfiles de expresión génica en esta escala en *T. cruzi* fue llevado a cabo por Minning y colaboradores, donde utilizaron microarreglos para evaluar los niveles de ARNm en cada etapa del ciclo de vida del parásito (Minning et al., 2009). En este estudio revelaron que cerca de un 50% de los genes analizados presentan niveles diferenciales de ARNm durante el ciclo de vida de *T. cruzi*, marcando que estos organismos regulan la abundancia de sus transcritos a pesar de la ausencia de regulación del inicio transcripcional. Estas conclusiones son muy destacables considerando las limitaciones de la metodología empleada, como son la baja sensibilidad y el limitado rango dinámico. Al mismo tiempo, se han llevado a cabo estudios proteómicos donde, a pesar del avance de estas metodologías recientemente, aún se obtienen un escaso número de genes diferencialmente expresados, principalmente justificado en la baja sensibilidad y poder cuantitativo de estas aproximaciones (Amorim et al., 2017; de Godoy et al., 2012). Nuestro grupo ha sido el primero en aplicar la transcriptómica basada en secuenciación masiva de ARNs (RNA-seq) en *T. cruzi*, en un trabajo donde se estudió la transición de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicas (Smircich et al., 2015). En este estudio se aplicó también la metodología de *Ribosome profiling* (Ribo-seq), donde se analiza la fracción de mensajeros asociados a los ribosomas (estudio del traductoma), y de esta forma se obtiene un panorama a nivel ómico de la síntesis proteica (Ingolia et al., 2009). En este estudio se comprobó que la transcripción es un proceso ubicuo en tripanosomátidos, dado que se detectó señal en el RNA-seq para más de 9.000 transcritos, en ambos estadíos, de los 10.600 en el genoma de referencia utilizado.

Asimismo, se vio que el procesamiento también actuaría de forma constitutiva para la mayor parte del genoma ya que estos transcritos son detectados al utilizar una estrategia de captura de los ARNs que poseen cola poli-A. Sin embargo, se pudo corroborar que, acorde a lo había sido observado previamente, existe expresión diferencial de un 25% de los genes a nivel de la abundancia de los mensajeros en el proceso de metaciclogénesis. Por otro lado, aplicando la aproximación de *ribosome profiling* se logró obtener estimaciones de los niveles proteicos para un conjunto de genes sin precedente en *T. cruzi*. Se detectaron 7.800 y 6.100 genes siendo traducidos en los epimastigotas y tripomastigotas respectivamente, lo cual representa aproximadamente 3 veces más genes de lo que los estudios proteómicos obtenían datos al momento de esa publicación. Curiosamente, se determinó una disminución considerable en los niveles de traducción para una gran proporción de genes en los tripomastigotas metacíclicos comparado a los epimastigotas, lo que indicaría que la regulación de la traducibilidad de los ARNm es muy relevante en el proceso de diferenciación a la forma infectiva. Determinando la tasa entre el nivel de expresión obtenido en el traductoma y el del transcriptoma se obtiene el parámetro denominado eficiencia traduccional para cada gen dado en dicha situación estudiada. Comparando los niveles de eficiencia traduccional entre diferentes grupos de genes se determinó que la familia de las proteínas ribosomales presentaba una alta eficiencia en epimastigotas que disminuye considerablemente en tripomastigotas, lo cual puede explicar en parte el menor nivel de traducción general en dicho estadio. El efecto opuesto se observa al analizar este parámetro en las familias de las transialidasas, que, por lo tanto, se traducen muy eficientemente en los tripomastigotas, donde tienen roles relevantes para el proceso de infección. Otro trabajo de nuestro grupo muestra que los genes específicos de estadio también son regulados por retención nuclear en los estadios donde no se expresan las proteínas que ellos codifican (Pastro et al., 2017). En epimastigotas se retienen en el núcleo, sin procesar, transcritos de genes de las familias de las transialidasas, DGF, RHS, GP63 y MASP, que son expresados en el estadio infectivo tripomastigota metacíclico.

Más recientemente, diversos estudios han aplicado la transcriptómica en diferentes cepas de *T. cruzi* y con el objetivo de aportar información sobre varios aspectos, como el desarrollo de estadios durante la infección y la metaciclologénesis, la adaptación de los parásitos a situaciones de estrés, y el análisis de la expresión génica de cepas con diferentes grados de virulencia (Berná et al., 2017; Callejas-Hernández et al., 2019; García-Huertas et al., 2023; Li et al., 2016; Libisch et al., 2021; Santos et al., 2018; Smircich et al., 2023). Incluso en un trabajo muy reciente utilizando los datos de RNA-seq del seguimiento de la infección de los amastigotas en un modelo de fibroblastos humanos (Li et al., 2016), se aplicó una metodología de análisis conocida como CDSeq (que representa, *Complete Deconvolution for Sequencing data*) para intentar identificar subpoblaciones de amastigotas con comportamientos diferentes (Desale et al., 2023). Esta metodología permite estimar en simultáneo tanto las proporciones de los distintos conjuntos celulares que componen la población y sus perfiles específicos de expresión génica. En particular en el trabajo de *T. cruzi*, los autores identifican 6 subpoblaciones de amastigotas, y específicamente una de ellas presenta características de parásitos no-replicativos dormantes, lo cual apoya el fenómeno ya descrito de persistencia de los parásitos en la etapa crónica de la patogénesis y la resistencia al tratamiento (Barrett et al., 2019; Sánchez-Valdéz et al., 2018).

A pesar de que está establecida la dependencia que los tripanosomátidos presentan en los mecanismos de regulación post-transcripcional, recientemente se ha visto que los mecanismos epigenéticos de regulación previa a la transcripción tienen efectos importantes sobre el control de la expresión génica impactando en procesos como el desarrollo a lo largo del ciclo de vida e incluso el control del ciclo celular en *T. cruzi* (Lima et al., 2022, 2021; Nunes et al., 2020; Ramos et al., 2015; Respuela et al., 2008; Rosón et al., 2022). Más aún, la organización genómica espacial ha sido propuesta como un mecanismo clave para la correcta expresión monoclonal en

T. brucei de las VSGs (del inglés, *variant surface glycoproteins*), las moléculas de superficie que recubren al parásito y permiten la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Faria et al., 2021). Estos resultados se obtienen aplicando la metodología de Hi-C (Lieberman-Aiden et al., 2009), que aprovecha el alcance de la secuenciación masiva de ADN para aplicarla sobre técnicas de captura de la conformación de los cromosomas. De esta forma se logran detectar masivamente las interacciones en el núcleo, dando lugar a lo que se ha dado a conocer como la genómica tridimensional (Belton et al., 2012; Kong and Zhang, 2019). Volviendo a *T. cruzi*, aquí la estrategia para modular la respuesta inmune es completamente diferente, ya que este parásito opta por un presentar un muy amplio y complejo repertorio de proteínas de superficie (Buscaglia et al., 2004). Sin embargo, se vio que la arquitectura genómica también juega un rol en este organismo donde su genoma se particiona en 2 compartimentos: uno llamado *core*, dedicado a los genes conservados y que muestra una alta sintenia con otros tripanosomátidos; y el otro llamado disruptivo, no sinténico, donde se encuentran la mayor parte de las familias multigénicas de proteínas de superficie (Berná et al., 2018). En un trabajo muy reciente que analiza a fondo las interacciones a nivel genómico en *T. cruzi* e integra conjuntos de datos de nivel epigenéticos, se observó que efectivamente estos 2 compartimentos se encuentran tridimensionalmente aislados en el núcleo celular (Díaz-Viraqué et al., 2023). Esto último tiene sentido en el contexto de que los conjuntos de genes que forman parte de cada uno requieren de mecanismos independientes de regulación para satisfacer las necesidades de expresión de los mismos en la biología del parásito. Más aún, se vieron indicios de que los compartimentos presentan diferencias en los niveles de metilación del ADN (m5C and m6A), en el posicionamiento de los nucleosomas y las interacciones cromosómicas que afectan a la dinámica de expresión del genoma, principalmente a nivel de la transcripción de los diferentes dominios topológicos. Este trabajo abre un escenario de análisis donde aún se requiere de mucho trabajo para elucidar los complejos mecanismos de regulación que emplea *T. cruzi* para expresar sus genes.

1.3 – El ciclo celular de *T. cruzi*.

En primer lugar, consideremos la definición de ciclo celular en organismos eucariotas como la secuencia coordinada de eventos que dan lugar a la duplicación celular, obteniéndose en el proceso 2 células idénticas a la inicial (Alberts et al., 1983). Este ciclo generalmente consiste en períodos de crecimiento celular, duplicación y segregación del material celular, y finalmente la división de la célula. Durante el ciclo celular prototípico se definen 4 etapas principales para facilitar su estudio, donde las etapas de duplicación del material genético (fase S) y de separación del material genético (fase M o mitosis) se encuentran separadas por dos fases *gap* o intervalo, conocidas como G1 y G2. Las fases G1 y G2 se caracterizan por presentar una gran actividad celular acompañada de una alta tasa metabólica; en particular en G1 se da el crecimiento de la célula en mayor medida, mientras que en G2 se da la reorganización de organelos preparando la división celular en la siguiente etapa. En paralelo a las últimas etapas de la fase M, usualmente se lleva a cabo la división del citoplasma (Citocinesis), que resultará finalmente en la formación de las nuevas células independizadas físicamente por la membrana plasmática. En eucariotas multicelulares donde se establecen tejidos con funciones especializadas para el organismo, es común que muchas células abandonen la sucesión de eventos del ciclo y pasen a un estado no proliferativo quiescente, conocido como etapa G0. En los tripanosomátidos, las formas infectivas como los tripomástigotas en *T. cruzi* permanecen en el estado G0, mientras que las formas replicativas no son infectivas, lo que sugiere que en estos organismos la proliferación y la infección serían procesos mutuamente excluyentes (Figura 1.4)(Passos et al., 2022). Para asegurar el correcto tránsito de las células por las diferentes etapas del ciclo proliferativo se precisa una maquinaria de control que regule las transiciones entre los eventos de forma que los mismo se den en el orden correcto y una única vez por ciclo. Así, el ciclo presenta varios puntos de control (o *checkpoints*) donde se detiene y se chequea que todo esté correcto y las condiciones sean favorables para continuar a la siguiente fase. Los checkpoints más conservados en los

modelos eucariotas tradicionales ocurren en G1/S, en G2/M y en el pasaje Metafase/Anafase dentro de la mitosis. En el checkpoint G1/S se evalúa que la disponibilidad de nutrientes sea favorable para la duplicación celular, la presencia de los mitógenos requeridos por la célula y la ausencia de señales anti-mitogénicas, y a partir de aquí se dice que la célula está comprometida irreversiblemente a dividirse. En esta fase se controla la integridad del genoma y que los precursores para iniciar la síntesis del mismo estén disponibles. En el checkpoint de G2/M se debe corroborar que la duplicación del material genético haya sido completada sin errores previo a iniciar la mitosis. Finalmente, durante el checkpoint Metafase/Anafase se evalúa que el alineamiento de los cromosomas en la placa metafásica sea correcto y luego se desencadena la segregación de las cromátidas en la Anafase. Respecto a los reguladores moleculares que controlan la progresión del ciclo celular, estos se encuentran bien descritos en los organismos eucariotas modelo (Poon, 2016). Para muchos de ellos se ha visto que la modulación ocurre a nivel post-traducciona, con eventos como la fosforilación/defosforilación y la proteólisis mediada por ubiquitinación con roles relevantes. Sin embargo, las ciclinas, uno de los factores clásicos en la progresión del ciclo celular, son dependientes de la activación a nivel transcripcional (Berckmans and De Veylder, 2009; Murray, 2004). Aquí vale la pena recordar que los tripanosomátidos no cuentan con los mecanismos para regular la iniciación de la transcripción para genes específicos, así que es esperable que en este punto presenten divergencias relevantes con lo observado en los modelos eucariotas tradicionales. La expresión génica a nivel transcripcional ha sido extensamente estudiada en el ciclo celular, dando lugar a análisis transcriptómicos dedicados específicamente a este proceso (Peña-Díaz et al., 2013; Wittenberg and Reed, 2005). De hecho, existe un repositorio de datos, denominado Cyclebase, donde se puede consultar tanto sobre un gen particular de interés, como investigar grupos de genes con niveles de transcripto regulados en el ciclo, los cuales son anotados como genes periódicos en esta base (Santos et al., 2015). En su última versión la base incluye 4 organismos modelo, el humano,

el modelo vegetal *Arabidopsis thaliana*, la levadura de la cerveza *Saccharomyces cerevisiae* y la de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

Si ahora nos enfocamos en el ciclo celular de los tripanosomátidos, este presenta particularidades específicas que aumentan su complejidad y dan lugar a puntos relevantes de divergencia con los procesos que se dan en los eucariotas modelo como el hospedero humano (Hammarton, 2007). Gran parte del conocimiento del ciclo en tripanosomátidos ha sido desarrollado en *T. brucei*, trabajando en el estadio procíclico que prolifera en las glándulas salivales de su vector, la mosca tse-tse (Wheeler et al., 2019). Una de las primeras dificultades proviene de que la célula a dividir es altamente polarizada y muestra una arquitectura celular compleja. Al mismo tiempo, se deben segregar varios organelos únicos y muy especializados, como la mitocondria, el flagelo y el cuerpo basal (Elias et al., 2007; McKean, 2003). La duplicación y segregación de estos organelos están pautados dentro el ciclo celular, a pesar de que no coinciden temporalmente con la división del genoma nuclear, pudiendo de esta forma dar lugar a diferentes puntos de control en el ciclo (Ploubidou et al., 1999). Así es que se habla de que dentro del ciclo celular habría 3 subciclos: el nuclear, el del kinetoplasto y el del citoesqueleto, donde el subciclo nuclear es el que presenta más similitudes con humanos y levaduras y los otros son más específicos de los tripanosomátidos (Figura 1.4)(Wheeler et al., 2019). A pesar de que los tres ciclos dependen de que la célula se comprometa al superar el punto de restricción G1/S, hay muy poca evidencia de que haya un diálogo cruzado coordinando estos 3 subciclos. De hecho, la evidencia actual ha mostrado que serían en principio independientes entre sí, dado que cuando se provocan fallas que interrumpen a alguno de los subciclos específicamente no se observa detención de los otros subciclos. De esta forma se observan parásitos aberrantes, que ya sea

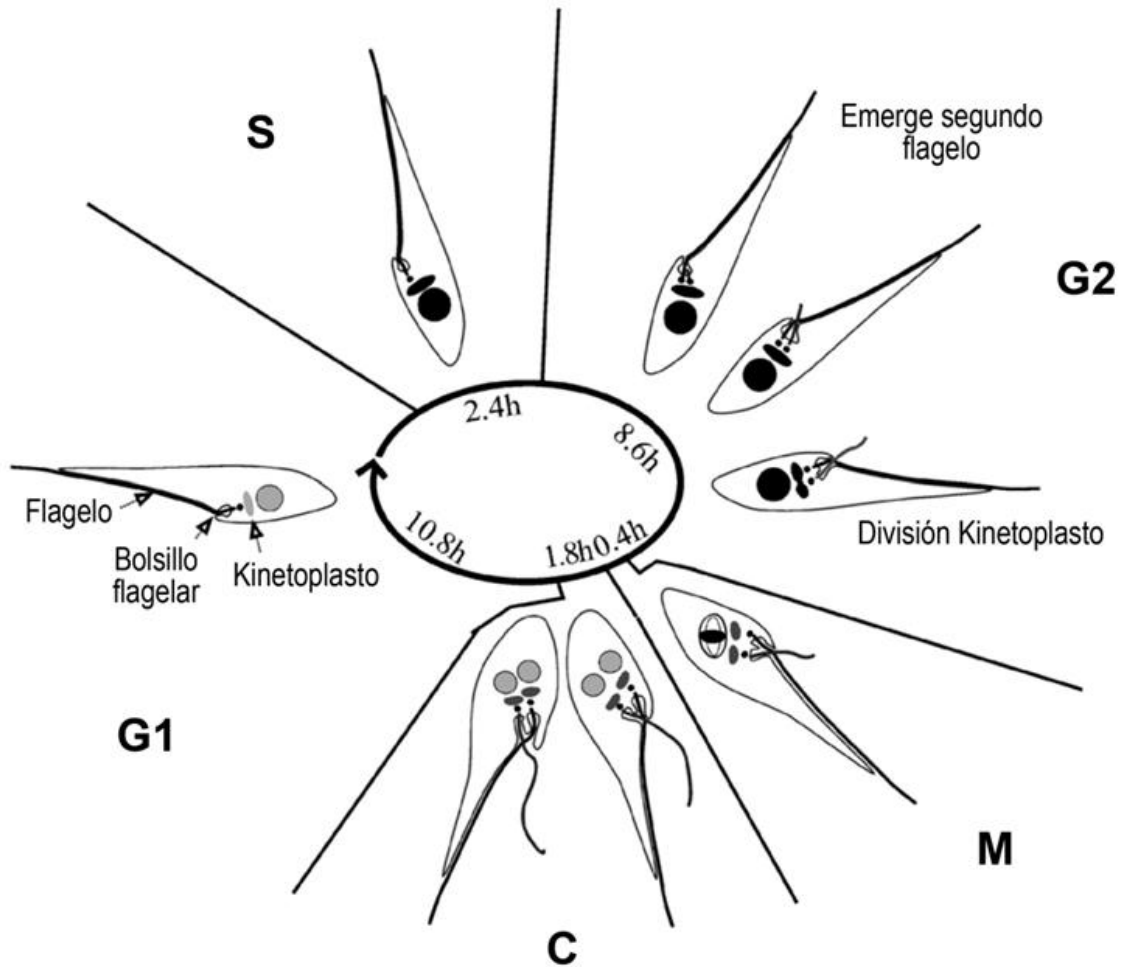


Figura 1.4 Cambios morfológicos durante el ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*. Se presentan los principales procesos morfológicos que se observan a medida avanza el ciclo celular. Los organelos que contienen ADN se presentan en gris cuando no está duplicado el material y en negro luego de la duplicación del material. Imagen tomada y modificada de Elias et al., "Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle" Protist. (2007).

acumulan en exceso o le faltan algunos organelos dadas divisiones asimétricas, o directamente la falta de división citoplasmática lleva a células con cantidades excesivas de organelos (Hammarton et al., 2003a; Hu et al., 2015; Tiengwe et al., 2012; Wang and Englund, 2001). Otro aspecto relevante es la integración que se requiere para coordinar la alternancia entre los estadios del desarrollo que son replicativos y los no-replicativos, integrando esto con la progresión del ciclo. Esto demuestra un grado alto de complejidad en los mecanismos de control a cargo de estas tareas. Las evidencias acumuladas han conducido a proponer el ciclo celular de los protozoarios patógenos como *T. cruzi*, como un punto muy relevante para identificar blancos

moleculares para el desarrollo de fármacos antiparasitarios, ya que la habilidad para dividirse y proliferar es esencial para la supervivencia de los organismos (Grant, 2008; Hammarton et al., 2003b; Naula et al., 2005).

Recordando que los tripanosomátidos son organismos muy basales en el árbol filogenético de los eucariotas, a pesar de que *T. brucei* y *T. cruzi* comparten muchas características, están evolutivamente alejados, habiendo divergido hace unos estimados 100 millones de años (Stevens et al., 1998). Esto explica que presentan grandes diferencias respecto a diversos aspectos de su biología celular y también de su patogenicidad. Por lo tanto, también es esperable que haya diferencias relevantes en los mecanismos que controlan la progresión del ciclo proliferativo. Centrándonos ahora más específicamente en *T. cruzi*, existen varios estudios de caracterización de actores particulares dentro del ciclo celular. A modo de ejemplo, la replicación de ADN con la maquinaria que participa en este punto ha sido examinada en detalle, demostrando que varios componentes de la misma presentan divergencia con los de humanos (Calderano et al., 2014, 2011b; Godoy et al., 2009; Zuma et al., 2021). Asimismo, también se han caracterizado las histonas y sus modificaciones, donde se vió que tanto los niveles de ARNm, como los proteicos, oscilan a lo largo del ciclo proliferativo, así como también en el ciclo de vida de *T. cruzi* (da Cunha et al., 2005; Nardelli et al., 2009; Recinos et al., 2001; Sabaj et al., 2001). Respecto a los reguladores canónicos del ciclo, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Basu et al., 2022), muchos trabajos del grupo de la Dra. Tellez-Lñon se ha dedicado a su caracterización, donde generalmente se corroboró que hay una relevante divergencia entre estas vías en los tripanosomátidos y los eucariotas superiores. En primer lugar, se trabajó en las proteínas equivalentes a las CDKs, que en los tripanosomátidos se denominan CRKs (del inglés, *cdc-2 Related kinases*), dado que esta familia de quinasas presenta homología con uno de los reguladores centrales del ciclo, la CDK1 o *cdc2* de humanos (Gómez et al., 2001, 1998). El primer trabajo se centró en TcCRK1 y dejó evidencia por primera vez de que las

quinasas del tipo CDKs son funcionales en *T. cruzi*. En el segundo, se caracterizó las actividades de TcCRK1 y TcCRK3, para las cuales se identificaron proteínas tipo ciclinas que podrían interaccionar con estas quinasas mediante ensayos de doble híbrido en levaduras. Más adelante, un nuevo estudio confirmó que la actividad catalítica de la proteína CRK3 presenta periodicidad a lo largo del ciclo, lo que apunta a que participe en procesos de control del ciclo celular (Santori et al., 2002). De las 11 ciclinas que fueron identificadas en el genoma de *T. cruzi*, dos de ellas han sido caracterizadas por el grupo de la Dra. Potenza. Primero, se demostró la actividad de la ciclina 2 (TcCYC2) en un ensayo de complementación en levaduras (Potenza et al., 2012). Luego se observó que los parásitos que sobreexpresan TcCYC2 presentan una disminución en el tiempo de duplicación, al mismo tiempo que se vé una acumulación de parásitos en la etapa G2/M. En el siguiente estudio, la ciclina 6 (TcCYC6) mostró características de ciclina mitótica, como era esperado dada su homología con ciclinas previamente caracterizadas (Di Renzo et al., 2016). Sobreexpresar esta ciclina mostró ser detrimental para la proliferación de epimastigotas y se determinó que sería blanco de degradación por ubiquitinación.

Los primeros estudios de genómica funcional del ciclo celular se realizaron en poblaciones sincrónicas de *T. brucei* (Archer et al., 2011). Parte de este trabajo se centra en presentar la novedosa metodología de elutriación como estrategia para obtener células en distintas etapas del ciclo. En este trabajo se determinó un total de 546 genes regulados, trabajando con un total de 4 fases del ciclo: G1 temprana, G1 tardía, S y G2/M. Observan que sólo una minoría de estos genes tiene homólogos relacionados al ciclo celular en humanos y levaduras. A pesar de esto, los estudios de ontología génica correlacionan con procesos celulares esperados para las correspondientes etapas del ciclo donde los genes se expresan. Por último, describen motivos de secuencia sobre-representados en las regiones UTRs de grupos de genes co-regulados, apuntando a la posible existencia de proteínas reguladoras que puedan ser responsables de la

expresión periódica de estos genes. De hecho, como parte de un trabajo previo de este mismo grupo, se había descrito que la RBP puf9 (de la familia de proteínas pumilio) mostraba niveles regulados a lo largo del ciclo celular y que se obtenía una acumulación de parásitos en la etapa G2/M al disminuir la expresión de este gen por RNAi (Archer et al., 2009). En este contexto vale mencionar que, en los tripanosomátidos, los regulones postraduccionales mencionados previamente podrían subyacer varios aspectos dentro del control de la progresión del ciclo celular en *T. cruzi*. Sin embargo, aún se ha estudiado poco respecto a este tipo de regulones relacionados a la expresión génica periódica en los tripanosomátidos (Clayton, 2019). El único regulón descrito, fue estudiado por el grupo de Dr. Ray en *Crithidia fasciculata*, corresponde a un motivo de secuencia hexamérico AUAGAAA, que determina la expresión cíclica de varios genes periódicos, el cual es reconocido por un complejo de proteínas denominadas CSBPs (de *Cycling Sequence Binding Proteins*) (Avliyakov et al., 2003; Mahmood et al., 2001, 1999; Mittra and Ray, 2004). Estas proteínas y una secuencia similar se han identificado también en genes de expresión periódica de leishmanias (Guha et al., 2014; Zick et al., 2005), *T. brucei* (Archer et al., 2011) y en *T. cruzi* (Chávez et al., 2017).

Luego más recientemente, se han realizado estudios varios estudios a nivel del proteoma del ciclo celular en *T. brucei* (Benz and Urbaniak, 2020; Crozier et al., 2018). En particular, el trabajo del grupo del Dr. Urbaniak investiga también el fosfoproteoma, tomando varios puntos a lo largo del ciclo celular. Aquí los autores encuentran que los cambios regulados por el ciclo celular en la abundancia de sitios de fosforilación son de mayor magnitud y más generalizados que los cambios en la abundancia de proteínas, al tiempo de que serían, en gran parte al menos, independientes entre sí. También notaron que existe un aumento generalizado en la fosforilación a medida se avanza en el ciclo celular, y que los genes blancos se encuentran enriquecidos en reguladores clásicos del ciclo celular y proteínas RBPs. Estos perfiles temporales de expresión

demuestran la importancia de la fosforilación dinámica en la coordinación de la progresión a través del ciclo celular y remarcan que las RBPs desempeñan un papel central en la regulación postranscripcional del ciclo celular en *T. brucei*. Sin embargo, las comparaciones genómicas integrales a nivel de transcriptoma, tranductoma y proteoma a lo largo del ciclo celular son escasas en la literatura y no se han realizado en tripanosomátidos previo a esta tesis. De hecho, aún son escasos los trabajos que analizan la expresión génica a nivel multiómico. La relevancia de la regulación postranscripcional de la expresión génica en tripanosomátidos los convierte en un modelo especialmente interesante para este tipo de estudios multiómicos. Recientemente, el ciclo celular de los tripanosomátidos también ha sido estudiado utilizando las más novedosas aproximaciones de transcriptómica de célula única (*Single-cell sequencing*) (Briggs et al., 2023). Esta aproximación se beneficia de trabajar con poblaciones celulares asincrónicas con ningún tipo de perturbación metodológica y fue aplicado sobre las formas proliferativas de *T. brucei*, los procíclicos y los sanguíneos de la forma *slender*. Los autores determinan que aproximadamente 1.500 transcriptos que presentarían modulación a lo largo del ciclo celular, 3 veces más que los obtenidos con transcriptómica convencional. De comparar sus datos con los del proteoma del ciclo de *T. brucei*, resultó relevante que no todos los cambios observados al nivel del transcriptoma *Single-cell* se condicen con niveles regulados de la proteína codificada, resaltando mecanismos complejos de regulación que actúan sobre este conjunto de genes en el ciclo celular.

Por todo lo expuesto previamente, en este trabajo de tesis nos propusimos avanzar en el entendimiento de los mecanismos que controlan la transición proliferativa G1/S en *T. cruzi* a nivel multiómico. Esto nos permitió por primera vez analizar el impacto de tres niveles de regulación de la expresión génica postranscripcional en tripanosomátidos. Por otro lado, nos permitió abordar la regulación de la expresión génica en una situación biológica de cambio rápido y reversible, a diferencia los cambios que ocurren durante el ciclo de vida, que son los más

estudiados por la genómica funcional. Considerando que de momento no existían estudios que apunten a esta temática en nuestro modelo de estudio, nos planteamos identificar los genes involucrados y las vías de regulación claves que gobiernan estos procesos, al mismo tiempo que se intentará identificar posibles módulos y mecanismos globales de regulación de la expresión génica. Para este fin, utilizamos la estrategia de *ribosome profiling* para la secuenciación masiva de ARNs en el proceso de traducción junto a proteómica cuantitativa. Luego, empleando herramientas de análisis bioinformáticos y de biología molecular apuntamos a identificar posibles regulones postranscripcionales que participen de la modulación conjunta de genes involucrados en esta transición clave para la proliferación del parásito.

OBJETIVOS

2.1 – Objetivo general.

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

2.2 – Objetivos específicos.

- Determinar la relevancia de los niveles de control postranscripcional en la transición proliferativa G1/S
- Identificar patrones de regulación postranscripcional de la expresión génica en la transición proliferativa G1/S, tales como genes-co regulados, coordinación entre niveles de regulación y otros.
- Identificar y caracterizar posibles regulones post-transcripcionales, que involucran elementos en *CIS* enriquecidos en las regiones reguladoras de conjuntos de genes co-regulados y factores en *TRANS*, tipo RBPs reguladoras de la expresión periódica de genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo de parásitos.

Para este trabajo se utilizó una cepa no nombrada de *Trypanosoma cruzi* aislada de pacientes en el INGEBI en Buenos Aires, que fue tipificada dentro del linaje TcI (DTU I) (Potenza et al., 2012). Esta selección se basa en que esta cepa responde logra un alto nivel de sincronización por Hidroxiurea (HU) (Galanti et al., 1994), a diferencia de varias de las cepas más tradicionalmente usadas de *T. cruzi*. Epimastigotas de esta cepa se cultivaron a 28 °C en medio BHT (de *brain heart tryptose*), suplementado con 10% de suero fetal bovino descomplementado por calor (FBS de *fetal bovine serum*; Capricorn Scientific GmbH). El medio BHT se preparó con 33 g de BHI (de *brain heart infusion broth*, BHI; Oxoid), 3 g de Triptosa (Sigma), 0,4 g KCl, 0,3 g de Glucosa, and 3,2 g Na₂HPO₄ y se suplementa con 10 mg de Hemina (Sigma) para finalmente llevarlo a un litro de volumen final, ajustando a pH 7,4.

El recuento de células en el cultivo se realizó utilizando cámara de Neubauer usando un microscopio de campo claro, con una previa fijación de los parásitos en paraformaldehído (PFA) 2% en Buffer Salino de Fosfatos (PBS) (NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, KH₂PO₄ 7 mM, Glucosa 6 mM, se llevó a pH 7,4).

3.2. Sincronización y análisis de citometría de flujo.

La sincronización de los cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* se realizó mediante el método de depleción del pool de desoxiribonucleótidos por incubación con Hidroxiurea (HU), descrito por Galanti y colaboradores (Galanti et al., 1994), y previamente puesto a punto para la cepa TcI

mencionada arriba (Chávez et al., 2017). En breve, se expone a un cultivo de parásitos en fase de crecimiento exponencial temprana (entre 2×10^6 y 4×10^6 parásitos/mL) a 20mM de HU por 24 horas, dado que el tiempo de duplicación de los parásitos es levemente menor a las 24 horas y de esta forma se asegura que todos los parásitos sean retenidos en el punto de control previo a fase S (Koç et al., 2004). Ya que se bloquea el ingreso a fase S, a las 24 horas de incubación se obtiene un cultivo enriquecido en fase G1. Luego se procede a lavar la HU del medio y resuspender a los parásitos en medio fresco para que retomen de forma sincrónica la progresión por el ciclo celular. Para esto se lava 2 veces con 1 volumen de PBS frío centrifugando a 1000 g a 4 °C durante 10 minutos y luego reemplaza el medio con medio BHI sin HU y se incuba a 28°C, colectándose parásitos en las diferentes etapas del ciclo a diferentes tiempos. Entre las 6-8 horas se obtiene una población enriquecida en parásitos en fase S y entre las 12-14 horas se observa lo mismo para parásitos en fase G2 (Galanti et al., 1994). La proporción de parásitos en cada etapa del ciclo celular se determinó por análisis del contenido de ADN de los cultivos utilizando tinción con Ioduro de propidio (Sigma, 25535-16-4) en células fijadas o Vibrant™ DyeCycle™ Orange Stain (ThermoFisher Scientific, V35005) en células vivas seguido de citometría de flujo, como se describió previamente (Chávez, 2012).

3.3. Preparación de muestras para *ribosome profiling* (Ribo-Seq).

Se realizaron tres experimentos de sincronización independientes en paralelo para colectar cultivos de parásitos enriquecidos en las fases G1 o S. Una vez colectados los parásitos se preparó la muestra de huellas protegidas por ribosomas (RFP, del inglés *Ribosome-Protected Footprints*) tratando al extracto citoplasmático con nucleasas en presencia de cicloheximida (CHX), como ha sido descrito previamente (Ingolia et al., 2009) y se ha optimizado para *T. cruzi* en nuestro grupo (Smircich et al., 2015). En breve, en este protocolo se incuban

aproximadamente 2×10^9 parásitos durante 15 minutos a 28°C en 100 µg/mL de CHX. El medio de cultivo es removido mediante 2 lavados por centrifugación a 1000 g a 4 °C durante 10 minutos con PBS suplementado con CHX a la misma concentración. El pellet se resuspende en un buffer de lisis hipotónico a 0°C (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 100 µg/mL de CHX, 5 mM de β-mercaptoetanol, suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa cOmplete mini EDTA-free de Sigma). La lisis celular se desencadena por el agregado del detergente no iónico NP-40 a una concentración final del 1%, facilitando el proceso por pipeteo suave y verificando mediante microscopía óptica el estado de los parásitos. Cuando se logra una lisis celular completa, la misma se detiene por el agregado de Sacarosa 2 M para lograr una concentración final del 15%. Se centrifuga a 4 °C por 20 minutos a 10.000 g y el sobrenadante postmitocondrial del lisado se carga sobre 2 mL de sacarosa al 33% y se somete a ultracentrifugación a 4 °C durante 2 horas y 45 minutos a 35.000 rpm en un rotor SW 40 Ti (Beckman). Luego de la centrifugación, la digestión se realiza con la ribonucleasa Benzonase® (Sigma, CAS N°: 9025-65-4), utilizando 250 unidades durante 10 minutos a 25 °C sobre el pellet de polisomas resuspendido en 200 µL de Lysis Binding Solution del kit de aislamiento de microARNs *mirVana*™ (Thermo Scientific™). El ARN digerido se purifica usando dicho kit y los fragmentos protegidos por los ribosomas (de aproximadamente 30 nucleótidos) se separan y purifican mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (FlashPAGE), como se ha descrito previamente (Di Paolo et al., 2020). Las preparaciones de las bibliotecas se realizaron utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ARN TruSeq v2 (Illumina®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bibliotecas de RFPs se secuenciaron en un secuenciador Illumina Novaseq 6000 (Leidos Biomedical Research, NCI-Frederick, Frederick, USA) para obtener lecturas de 76 pb de extremo único (*single-end*). Las seis bibliotecas (triplicados de RFPs para las fases G1 y S) se prepararon en paralelo y se secuenciaron en la misma corrida del secuenciador.

3.4. Procesamiento de lecturas de secuencias, mapeo y expresión génica diferencial.

Las lecturas se recortaron utilizando "fastx_clipper" (FASTX_Toolkit, v0.0.14) con los parámetros -a AAGATCGGAAGAGCACACGTCT -c -l 18 -M 10, con el propósito de retener únicamente las lecturas con una longitud superior a 18 pb que contengan el adaptador de Illumina en el extremo 3' con un alineamiento mayor a 10 pb. No consideramos necesario realizar un filtrado adicional por calidad al verificar a través del análisis FastQC que se observaban scores de *Phred* superiores a 28 para cada base. Las lecturas se mapearon al genoma de *T. cruzi* cepa CL-Brener (haplotipo *Esmeraldo-like*, v4.2, descargado de [TriTrypDB](#)) utilizando bowtie2 con los parámetros --very-sensitive-local. Elegimos trabajar con el haplotipo *Esmeraldo-like* ya que obtuvimos un mayor porcentaje de mapeo con la cepa TcI utilizada en nuestro estudio, en comparación con el haplotipo *non-Esmeraldo-like*. Las lecturas que se mapearon a *features* del tipo *mRNA* se contaron utilizando el programa HTSeq (v0.6.0) en el modo de unión con el resto de los parámetros por defecto.

La expresión génica se presenta como conteos de huellas ribosomales normalizadas (nRFP, de *normalized ribosomal footprints*), que resulta de la normalización aplicada por el paquete DESeq2 (Love et al., 2014). Esta normalización tiene en cuenta tanto la longitud del transcrito como la profundidad total de la librería de secuenciación para cada réplica. Para comparaciones globales entre los conjuntos de datos, se utilizaron 15 nRFPs como el único umbral para determinar los genes del traductoma que se incluirían en esos análisis. Sin embargo, los genes representados por al menos 40 nRFPs se consideraron para el análisis de expresión diferencial, ya que se encontró que este era el umbral para una varianza interreplicas estable y baja (datos no mostrados). La expresión génica diferencial se evaluó utilizando el paquete DESeq2, y los

genes regulados en la traducción en las fases G1/S se definieron como aquellos con un cambio mayor a 2 respaldado por un valor de FDR menor de 0,05. Las listas de genes diferenciales o DEGs (del inglés *Differentially Expressed Genes*) se analizaron en busca de términos de ontología génica (GO) enriquecidos utilizando la herramienta de análisis en línea disponible en [TriTrypDB](#), la cual implementa una prueba exacta de Fisher en la lista de genes de consulta en comparación con la lista de genes control para definir los términos GO sobrerrepresentados. Un *P* valor ajustado de Bonferroni menor a 0,01 se consideró como el umbral para una sobrerrepresentación significativa. Se generaron *heatmaps* en el servidor web Morpheus del Broad Institute aplicando una agrupación de filas y de columnas por correlación de Pearson (79). Se seleccionaron genes con niveles elevados de traducción para el análisis de periodicidad en las huellas ribosomales, tal como se recomienda en el trabajo de Ingolia del 2011 (Ingolia et al., 2011). Brevemente, los genes seleccionados presentan una media de cobertura base en su secuencia codificante (CDS) de al menos 10 lecturas, calculada con una ventana deslizante de 15 nucleótidos, excluyendo los primeros 15 y los últimos cinco codones. Para estos genes se calculó la periodicidad en el mapeo del extremo 5' de las lecturas de huellas ribosomales y se presenta en un gráfico la diferencia entre la proporción observada (obs) con la esperada (exp) de la distribución de los mapeos del extremo 5' en los tres marcos de lectura diferentes (Biever et al., 2020).

3.5. Preparación de muestras para análisis proteómico.

Se llevaron a cabo dos experimentos de sincronización independientes en paralelo, uno para el aislamiento de las muestras de fases G1 y otro para S; en ambos casos se realizaron 2 réplicas trabajadas en paralelo y simultáneo. Se lisaron 5×10^8 células para cada población enriquecida en el ciclo celular, resuspendiendo el pellet de parásitos en 1 mL en una solución de lisis (8% de

SDS, 200 mM de Tris, pH 8,5, 200 mM de ditioneitol y suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa cOmplete mini EDTA-free de Sigma) e incubando a 95°C durante 5 minutos. Las muestras de péptidos para el análisis mediante espectrometría de masas se prepararon en laboratorio del Dr. Urbaniak en la Universidad de Lancaster del Reino Unido durante una estadia de investigación, según lo descrito por Urbaniak y colaboradores (Urbaniak et al., 2013), que se basa en el procedimiento de preparación de muestras con filtro (FASP, de *Filter-aided sample preparation*) con algunas modificaciones (Wiśniewski et al., 2009). En breve, las muestras de proteínas se descongelaron para obtener un total de $2,5 \times 10^6$ células lisadas (en 0,5 mL), se solubilizaron en SDS al 4% y luego se realizó una alquilación reductiva en la unidad de filtración (límite de peso molecular de 30,000 KDa, Vivascience) utilizando el procedimiento FASP adaptado para los volúmenes más grandes, como los usados por nosotros. La muestra se digirió con una relación de 1:100 (m/m) de Tripsina gold (Promega) en la unidad de filtración durante 18 horas a 37°C. Los péptidos tripticos se eluyeron por centrifugación y el filtro se lavó secuencialmente con 1 mL de NH_4HCO_3 50 mM y 1 mL de NaCl 0,5 M. Se combinaron los eluidos y se realizó un desalado empleando una columna C_{18} de 500 mg (SepPak; Waters) y el nuevo eluido se liofilizó. Con el fin de reducir la complejidad de la muestra, las preparaciones de péptidos se fraccionaron utilizando el kit de fraccionamiento de péptidos en una columna de alto pH de fase reversa (Thermo Scientific™, Pierce). Se fue aumentando la proporción de acetonitrilo (ACN) para obtener diferentes eluidos, comenzando en 0% ACN = FT (de *Flowthrough*), luego 2% ACN, 3% ACN, 4% ACN, 6% ACN, 10% ACN, y 50% ACN para finalizar. Posteriormente, los diversos eluidos se combinaron en 4 fracciones (F1 = FT 1 4% ACN; F2 = 2% ACN 1 4% ACN; F3 = 3% ACN 1 50% ACN y F4 = 6% ACN) basadas en la cuantificación de péptidos y en la naturaleza hidrofóbica de los péptidos que se espera en cada eluido. La cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS) se realizó en las instalaciones proteómicas de FingerPrints en la Universidad de Dundee (Reino Unido). La cromatografía líquida se llevó a cabo en un sistema totalmente automatizado Ultimate U3000 nano-LC (Dionex)

equipado con una columna de trampa PepMap C₁₈ de 1 x 5 mm y una columna nanocolumns PepMap C₁₈ de 75 x 15 cm de fase reversa (LC Packings; Dionex). Las muestras se cargaron en 0,1% de ácido fórmico (buffer A) y se separaron utilizando un gradiente binario que consistía en el buffer A (0,1% de ácido fórmico) y el buffer B (90% de cianuro de metilo [MeCN], 0,08% de ácido fórmico). Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal del 5% al 40% de buffer B durante 65 minutos. El sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se acopló a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific™) equipado con una fuente de ionización Proxeon nanospray. El espectrómetro de masas se operó en modo dependiente de datos para realizar un barrido de encuesta en un rango de 335 a 1.800 m/z en el analizador Orbitrap (R = 60.000), con cada escaneo MS que desencadenaba 15 adquisiciones MS2 de los 15 iones más intensos en la trampa de iones LTQ. El analizador de masas Orbitrap se calibró internamente sobre la marcha utilizando la masa de bloqueo de polidimetilsiloxano ciclosiloxano a m/z 445,120025. Las cuatro muestras de proteínas (duplicados de las fases G1 y S) se procesaron en paralelo, y el análisis de MS se realizó en tándem.

3.6. Análisis de los datos proteómicos.

Los datos se procesaron utilizando el software MaxQuant15 (versión 1.3.0.5), que incorpora el motor de búsqueda Andromeda (Cox and Mann, 2008). Las proteínas se identificaron mediante la búsqueda en una base de datos de secuencias de proteínas que contenía proteínas anotadas de *T. cruzi* (versión 4.2, descargada de [TriTrypDB](#)) complementada con contaminantes frecuentemente observados (tripsina porcina, albúminas séricas bovinas y queratinas de mamíferos). Los parámetros de búsqueda especificaron una tolerancia de MS de 6 ppm, una tolerancia de MS/MS de 0,5 Da y especificidad de tripsina completa, permitiendo hasta dos péptidos no clivados. La carbamidometilación de la cisteína se configuró como una modificación

fija, y la oxidación de las metioninas, la acetilación de la proteína en N-terminal y el N-pirolglutamato se permitieron como modificaciones variables. Los grupos de proteínas se descompusieron en genes individuales para permitir una comparación directa con los conjuntos de datos de secuenciación, mientras que la información de genes multicopia se extrajo y se presentó en la tabla de datos de proteómica (Tabla S2 en (Chávez et al., 2021)). Para los análisis de detección comparando entre los conjuntos de datos, se utilizó al menos 1 péptido único como el único umbral para determinar los genes del proteoma que se incluirían en dichos estudios. Sin embargo, para comparaciones de expresión, se consideraron proteínas con al menos un valor de intensidad LFQ (de *Label Free Quantification*) en una réplica de cada una de las fases del ciclo celular. Solo las proteínas con valores de intensidad LFQ válidos en las cuatro réplicas se analizaron para la expresión diferencial, y aquellas que mostraban un cambio mayor a 1,5, respaldado por un FDR inferior a 0,05 se consideraron genes diferencialmente expresados o DEGs. La decisión de utilizar un umbral de 1,5 veces para los DEGs del proteoma es la menor sensibilidad y rango dinámico que posee esta metodología. También se consideraron DEGs a las proteínas detectadas sólo en una etapa del ciclo celular con valores LFQ por encima del percentil 25 en ambas réplicas.

3.7. Análisis de agrupamiento de genes co-expresados.

Para seleccionar un grupo de genes con valores de cambio confiables tanto en el traductoma como en el análisis proteómico, aplicamos un conjunto de filtros a datos. En primer lugar, seleccionamos los genes con más de 40 nRFPs en el experimento de *ribosome profiling*. Luego, solo consideramos las proteínas clasificadas como "copia única" en este análisis, para evitar redundancia en los perfiles de expresión de proteínas pertenecientes a familias génicas. En este caso, no establecimos un filtro probabilístico ni un umbral arbitrario en los valores de cambio con

el objetivo de mantener un conjunto más grande de genes con datos en ambos estudios para construir los perfiles de co-expresión. Los análisis de agrupación y los *heatmaps* se obtuvieron en el servidor web Morpheus del Broad Institute, aplicando agrupación de las filas y las columnas por correlación de Pearson. Se tomó un umbral arbitrario a partir de la observación de la matriz de distancias que resultó en 8 grupos de genes putativamente co-regulados.

3.8. Identificación de motivos de secuencia lineal en regiones UTR

En primer lugar, se obtuvieron las regiones 5' y 3' UTR para los diferentes grupos de genes usando la herramienta *Sequence retrieval* de TritypDB (Shanmugasundram et al., 2023), donde se ingresa el conjunto de Identificadores génicos deseados y se selecciona secuencias genómicas para obtener los archivos FASTA correspondientes. En el cuadro donde se selecciona la región de interés se marcó iniciar en “- 200” y terminar en “+ 0” del codón de inicio anotado para el gen y así se obtuvieron las regiones 5'-UTR. En el caso de las regiones 3'-UTR se marcó iniciar en “+ 0” y terminar en “+ 450” respecto al codón de finalización anotado para el gen. Luego se utilizaron estos archivos FASTA para la identificación de los motivos de secuencia lineal utilizando la herramienta STREME (Bailey, 2021), de la suite de herramientas MEME (Bailey et al., 2009). En breve, para cada búsqueda en particular se ingresa el archivo fasta para el grupo de genes donde se quiere identificar el motivo en el *Input*, y un grupo control seleccionando considerado como *user-provided sequences*. Se selecciona la opción de convertir a ARN la secuencia para evitar que se identifiquen motivos en la hebra complementaria a la que proporcionamos. Para la identificación de motivos cortos, candidatos a ser sitios de unión de RBPs, se seleccionó un largo esperado entre 5-8 nt y un *p*-valor umbral de 0.05. Por último, para los diagramas posicionales se seleccionó alineamiento a la derecha para las 5'-UTRs y a la izquierda para las 3'-UTRs.

3.9. Manipulación de ácidos nucleicos para el clonado en el vector reportero.

En primer lugar, se obtuvo ADN genómico de parásitos de *T. cruzi* de la cepa de trabajo TcI (Potenza et al., 2012). Se colectaron 1×10^9 parásitos en fase exponencial de crecimiento y se lavó el medio de cultivo por centrifugaciones durante 10 minutos a 1600 g y se realizó un lavado con buffer fosfato (PBS). El pellet final se resuspendió en la 100 μ L de PBS frío y se utilizó el kit Monarch® Genomic DNA Purification (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante y el protocolo recomendado para levaduras. Se obtuvieron cantidades de ADN genómico suficientes y un grado de pureza adecuado para ser utilizado para amplificación por PCR.

Se diseñaron oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' de la 3'-UTR del gen *puf9* agregando en los extremos sitios de corte de las enzimas de restricción XhoI y NheI necesarias para el posterior clonado del fragmento amplificado en el vector reportero pTcDUAL. Se ordenó la síntesis de estos cebadores para la amplificación de la región 3'-UTR de *puf9* a la empresa Macrogen (Korea) y su clonado en el vector reportero; los oligonucleótidos sintetizados se presentan en la siguiente tabla:

Nombre	Secuencia*	Tm**	Enzima de restricción
Fwd_clonado_puf9	5'-TCTCTC ctcgag TGACGGTCGCCGCAACAATGGTG-3'	61 °C	XhoI
Rev_clonado_puf9	5'-TCTCTC gctagc CCGTTGCAGGAGGCATACAACCACA-3'	56 °C	NheI
M13_rev universal	CAGGAAACAGCTATGAC	56 °C	--

*En **negrita** se marcan los sitios de las enzimas de restricción correspondientes y en *itálicas* se muestran un tracto adicional de bases que se incorpora para permitir la digestión directamente sobre el producto de amplificación. En mayúscula se indica la secuencia complementaria a la región de la 3' UTR del gen *puf9* que se usó para amplificar la región de interés.

**Tm hace referencia a la temperatura de *melting* o desnaturalización media de los cebadores, la cual considera solamente la región que hibrida con el ADN genómico para esto (región sin negrita ni itálica en la secuencia).

Se amplificó la región 3'-UTR de *puf9* a partir de 50ng de ADN genómico, utilizando la enzima DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, realizamos reacciones de PCR en volumen final 50 µL con 2,5 unidades de enzima, mezcla de dNTPs con 0.2 µM final cada uno y los cebadores en 0,1 µM final cada uno. Inicialmente, se seleccionó la temperatura óptima de amplificación probando diferentes temperaturas de hibridación en un rango entre 52°C y 62°C y analizando los productos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. Determinamos que a 61°C es la temperatura óptima donde se obtiene un producto mayoritariamente único. Se escindió una banda del gel conteniendo al producto del tamaño esperado (1047 pb) y éste se purificó utilizando el kit Monarch® DNA Gel Extraction kit (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El fragmento de ADN purificado de gel se digirió utilizando las enzimas NheI (NEB) y XhoI (Thermo Scientific™) en una reacción única en buffer Tango 1X a 37°C por 16 horas. Para esta digestión doble se deben utilizar 2 y 8 Unidades de Enzima para NheI y XhoI respectivamente para 500 ng de ADN dada la diferencia de actividad en estas condiciones de reacción (100% y 20-50% según la herramienta Double Digest Calculator de Thermo Scientific™). Un procedimiento equivalente se empleó para digerir el vector pTcDUALuc cedido por la Dra. Leticia Pérez-Díaz (Pérez-Díaz et al., 2017), en acuerdo también con la Dra. Santuza Teixeira que lo desarrolló (Araújo et al., 2011).

Realizamos la ligación de los extremos cohesivos del fragmento y el vector, ambos digeridos con las enzimas NheI y XhoI, utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific™) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en presencia de 1 Unidad de enzima se incubaron a 25 °C por 10 minutos 35 ng de inserto con 50ng de vector linealizado en un volumen final del 20 µL, lo que implica una relación de 7:1 de exceso de moléculas de inserto por vector

(calculada utilizando la herramienta NEBioCalculator® de NEB). Inmediatamente se procedió a transformar bacterias quimiocompetentes de la cepa TOP10 de *E. coli*, incubando 5 µL de la ligación con 50 µL de bacterias por 20 minutos a 0°C. Luego se realiza el shock térmico por 90 segundos a 42°C, se pasa a incubar por 2 minutos a 0°C y luego se agregan 4 volúmenes de medio SOC (2 g Triptona, 0,5 g Extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glucosa en 100 mL), 220 µL en este caso, y se incuba a 37 °C con agitación de 200 RPM por 1 hora para recuperar las células. Luego se plaquea en LB-Agar (formulación Lennox: 15 g Agar, 10 g Triptona, 5 g Extracto de Levadura, 5 g NaCl para 1 L volumen final), suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incuba por 16 horas a 37 °C.

Al día siguiente las colonias positivas se pican para inocular un precultivo de 3 mL de LB líquido suplementado con ampicilina 100 ug/mL y se estría una placa nueva de LB-Agar para aislar una colonia. Al siguiente día, una colonia aislada de cada estría se analizó por PCR para confirmar la presencia del inserto por PCR de colonia. En breve, se toca con un ansa estéril una colonia bacteriana aislada y se sumerge el ansa en un tubo con 100 µL de agua desionizada estéril. Luego se calienta el tubo a 100 °C por 5 minutos para lisar las bacterias, se centrifuga a 16.000 g por 5 minutos para eliminar fragmentos celulares y se utilizan 10 µL de sobrenadante como molde para la PCR. La misma se realiza en las condiciones presentadas más arriba, pero utilizando como cebador reverso el oligo universal M13 que se ubica cercano al sitio de clonado de NheI en el vector. De esta forma, al analizar el resultado en una electroforesis de Agarosa se confirma que el inserto se incorporó efectivamente al plásmido pTcDUALuc. Se realizó una segunda confirmación por digestión doble del plásmido para los clones positivos, utilizando XhoI y NheI y el procedimiento explicado más arriba. El resultado de la digestión se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y los clones que mostraron ligación se enviaron a secuenciación por método de Sanger en MacroGen Inc, Korea. Las secuencias obtenidas fueron

alineadas con la secuencia esperada del vector construida en el software SnapGene™, para verificar la posición y orientación del inserto, así como la ausencia de mutaciones.

3.10. Transfección por electroporación en cultivos de epimastigotas de *T. cruzi*.

Cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* en fase de crecimiento exponencial temprano ($4-6 \times 10^6$ p/mL) se centrifugaron 10 min a 1600g para remover el medio de cultivo. Se realizó un lavado en buffer fosfatos (PBS, pH 7.4) y luego 1×10^8 parásitos se resuspendieron en 20 μ L de Solución de electroporación P3 (P3 Primary Cell 4D-Nucleofector, V4XP-3024, Lonza™) en presencia de 5 μ g de plásmido (pTcDUALuc_puf9). Se cargaron los parásitos en strips de celdas de 20 μ L para realizar 2 pulsos con el programa (EH100) utilizando el electroporador (Amaxa 4D Nucleofector system, Lonza™), e inmediatamente se recuperaron transfiriendo a los parásitos a 1 mL de medio BHI fresco (Cordero et al., 2019).

3.11. Detección de actividad Luciferasa del vector reportero.

Para la detección de las actividades de las luciferasas *Renilla* y *Firefly* se utilizó el kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, se centrifugan 2×10^6 parásitos a 3000 g por 5 minutos y el pellet se resuspende en 75 μ L de PBS a los que se le agregan 75 μ L de Dual-Glo® Reagent y se transfiere la mezcla a una placa de 96 pocillos blancas opacas. Se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la lisis de los parásitos y la reacción enzimática con el sustrato y se mide en un luminómetro la actividad de la *Firefly* luciferasa. Luego se incorpora al mismo pocillo 75 μ L del Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent, se mezcla suavemente por pipeteo y se incuba nuevamente por 10 minutos

antes de medir la actividad de la Renilla Luciferasa en el luminómetro. Estas medidas se realizaron en paralelo para los 4 experimentos de transfección con el sistema reportero para la evaluación de los motivos. La actividad de vector reportero de la luciferasa *Firefly*, que porta la región 3'-UTR del gen *puf9* se normaliza con la actividad del gen *Renilla* luciferasa que porta una UTR propia no regulada para corregir con la variabilidad del método.

RESULTADOS

4 – Análisis multiómico de la transición proliferativa G1/S.

4.1 – Remodelación traduccional y proteómica en la transición G1/S del ciclo celular de epimastigotas de *T. cruzi*.

Se utilizó la incubación con hidroxiaurea (HU) para sincronizar cultivos de epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa TcI (Potenza et al., 2012), siguiendo el procedimiento propuesto inicialmente por Galanti y colaboradores (Galanti et al., 1994) y utilizado con éxito previamente en nuestro grupo (nuestras). Al finalizar la incubación por 24 horas con HU se obtienen una población enriquecida en parásitos en fase G1 tardía a tiempo 0 horas y otra enriquecida en parásitos en fase S luego de cultivar en medio fresco sin HU por 6 horas. En todos los casos se obtuvieron enriquecimientos de aproximadamente 70% para cada una de las poblaciones (Figura 4.1-A). Después de colectar los parásitos enriquecidos en cada una de las etapas del ciclo se procedió al aislamiento de la fracción poli-ribosomal por ultra centrifugación diferencial del sobrenadante post-mitocondrial en colchones de sacarosa, como se ha hecho anteriormente (Smircich et al., 2015). Sobre la fracción obtenida se realiza una digestión enzimática controlada con una endonucleasa, a modo de eliminar las regiones de ARNm no protegidas por el ribosoma. Los fragmentos de ARN protegidos resultantes, también conocidos como “huellas ribosomales”, son purificados y utilizados para generar librerías de secuenciación masiva. El recuento de lecturas de estas librerías es una medida de la ocupación de los ribosomas sobre los ARNm, que nos proporciona una estimación de la traducción de cada ARNm presente en la célula en un momento dado. Por lo tanto, esto nos permite acceder a una estimación al nivel de las distintas proteínas sintetizadas en la célula de una forma más sensible que lo que las técnicas proteómicas aún permiten hoy en día. A pesar de que este enfoque no puede distinguir entre ribosomas activos y estancados, ha demostrado ser un método exhaustivo y cuantitativo para evaluar la traducción a nivel ómico.

- RESULTADOS -

Las muestras preparadas se secuenciaron en un Novaseq 6000 (Illumina®), lo que produjo más de 18 y 13 millones de lecturas de 76 pb para G1 y S respectivamente. Estas lecturas se mapearon al genoma del haplotipo de *T. cruzi* CL-Brener Esmeraldo-like (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimientos de las estrategias ómicas aplicadas

	Chavez et al., 2017		Chavez et al., 2021			
	Transcriptoma		Traductoma		Proteoma	
	G1	S	G1	S	G1	S
Lecturas totales	44,452,981	44,514,247	182,662,456	139,206,830	Espectros totales MS	42,176 44,626
Lecturas mapeadas*	32,152,658	32,066,826	18,729,069	19,742,148	Espectros MS/MS	254,093 277,296
Lecturas en ARNm**	8,894,823	8,775,527	6,700,895	5,050,266	Péptidos identificados	10,694 15,986

* Mapeos al haplotipo *esmeraldo-like* del genoma de CL-Brener, ** Lecturas no *multimatch*

Para identificar las lecturas resultantes de fragmentos de ARNm protegidos por ribosomas se buscó el adaptador de Illumina® en el extremo 3' de la lectura. Se recortó la secuencia correspondiente al adaptador y solo se utilizaron las lecturas recortadas para la etapa de alineamiento. Se calcularon y normalizaron los recuentos de lecturas por gen, lo que dio como resultado una estimación de la traducción sobre los mismos (nRFP, de normalized ribosomal footprints), que se presenta para los 9.487 genes detectados (Tabla S2 de Chavez et al, 2021). Los triplicados mostraron una distribución esperada, como se puede apreciar en el análisis de componentes principales, donde las réplicas se agruparon y se separaron entre sí por el primer componente que contiene el 84% de la varianza (Figura 4.1-B). Dado que estos análisis apoyan la calidad de la secuenciación, se llevó a cabo un análisis de traducción diferencial, donde los genes con más de 40 nRFPs, que mostraban un cambio absoluto mayor a 2 y una tasa de falsos descubrimientos (FDR) menor a 0,05, fueron considerados genes diferencialmente traducidos (R-DEGs, de Ribosomal Differentially Expressed Genes). Esto dio lugar a un total de 1.784 genes regulados en la transición G1/S (R-DEGs), con 923 y 861 genes regulados al alza en G1 y S respectivamente (Figura 4.1-C y D; Tabla S2 de (Chávez et al., 2021)).

- RESULTADOS -

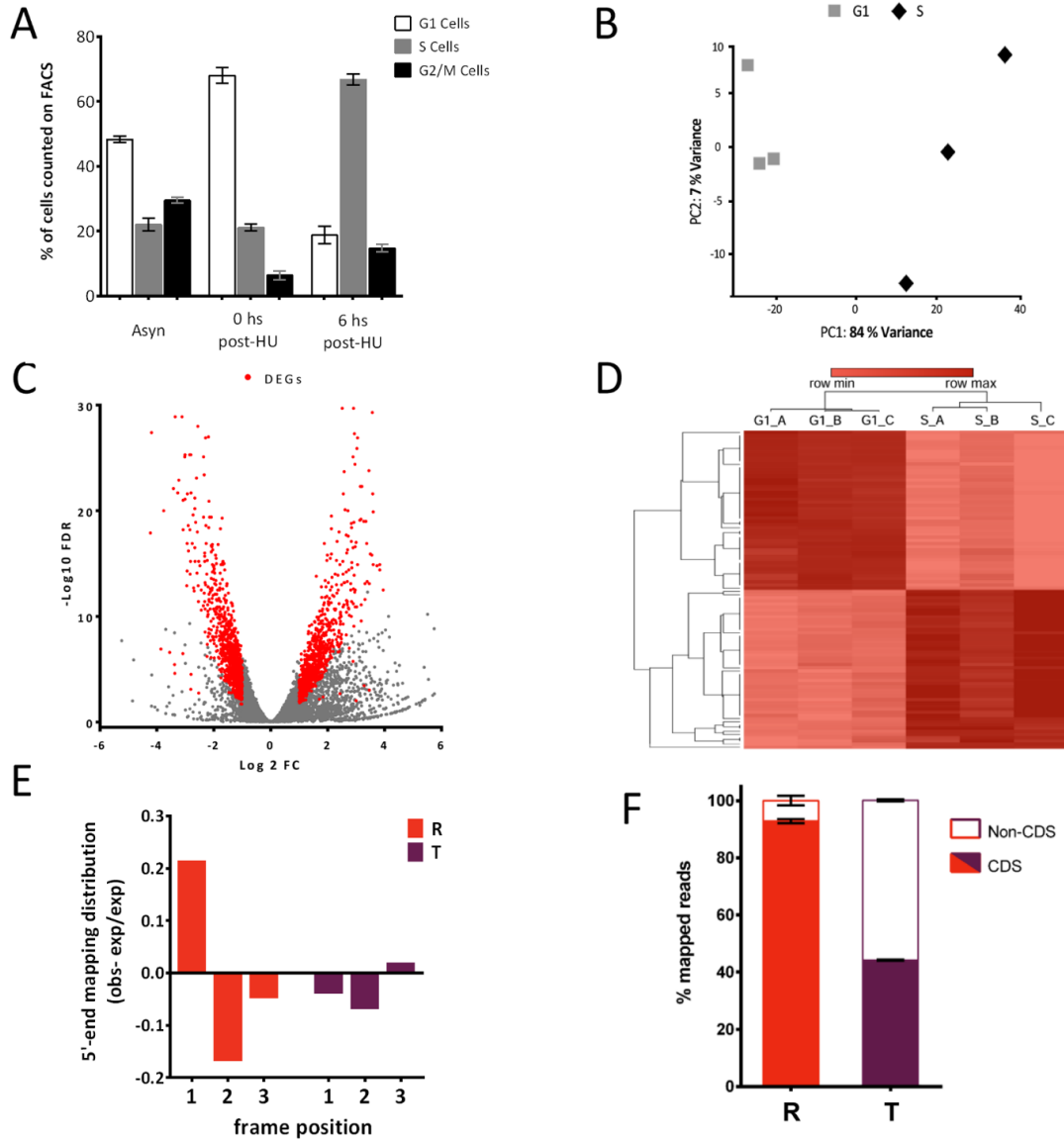


Figura 4.1. Generación y evaluación de huellas ribosomales (Ribo-seq). **A.** Análisis de ADN por citometría de flujo en una tinción con Ioduro de Propidio de las poblaciones de epimastigotas de *T. cruzi* sincronizadas por Hidroxiurea (HU) utilizadas para extraer las muestras de Ribo-seq. Se muestra la distribución de células en fase G1 (contenido 2C, en blanco), fase S (contenido entre 2-4C, en gris) y en fase G2/M (contenido 4C, en negro) para las siguientes poblaciones de cultivos: población asincrónica (Asyn), población enriquecida en fase G1 (0 hs post HU) y una población enriquecida en fase S (6 hs post HU). **B.** Análisis de componentes principales (PCA) para los valores de expresión génica de las réplicas, tanto para la población enriquecida en fase G1 (cuadrados grises), como para la población enriquecida en fase S (diamantes negros). **C.** Distribución de los valores de FDR (*false discovery rate*) de cada gen contra el cambio en la expresión (*Volcano plot*) en la transición G1 a S. Con puntos rojos se representan los genes clasificados como diferencialmente expresados (DEGs, de *differentially expressed genes*), mostrando cambios de una magnitud mayor a 2 soportados por un FDR menor a 0.05 en genes representados por al menos 40 lecturas normalizadas en el Ribo-seq (nRFPs, de *normalized ribosomal footprints*). **D.** Mapa de calor (*heatmap*) del número de lecturas de huellas normalizadas (log2 nRFPs) de las 3 réplicas secuenciadas, para los 100 genes con mayor cambio en la transición G1/S (50 genes al alza en fase G1 y 50 genes al alza en fase S). Se utiliza escala logarítmica. **E.** Tasa de cambio entre los valores observados y esperados para la distribución de mapeo de los extremos 5' en las lecturas del experimento de Ribo-Seq (R) en cada uno de los marcos abiertos de lectura. Como referencia se presentan los mismos valores para los datos de transcriptoma (T) previos de nuestro grupo (Chavez, et al. 2017). **F.** La proporción de lecturas mapeadas sobre las regiones codificantes de proteínas (CDS, en color) y sobre las regiones intergénicas (Non-CDS, en blanco) se presentan para los datos de Ribo-Seq (R) y para los datos de transcriptoma (T).

Un ensayo de huella ribosomales debería mostrar una periodicidad de 3 bases en la posición de mapeo del extremo 5' de las lecturas, correspondientes a la traslocación en el avance del ribosoma, así como un mapeo preferencial sobre las secuencias codificantes de proteínas (CDS) (Ingolia et al., 2009; Smircich et al., 2015). A su vez, ambas características no son esperables para un ensayo de RNA-seq tradicional. Para verificar la periodicidad, discriminamos las lecturas por longitud, determinamos el desplazamiento del sitio P para cada longitud de lectura y calculamos la periodicidad de extremo 5' tomando genes que mostraban una cobertura global continua, tal como se reportó en el artículo original de Ribo-seq (Ingolia et al., 2009). Se pudo observar periodicidad en los datos del traductoma, ya que las RFP correspondían preferencialmente con la primera posición del codón, mientras que la segunda posición era la menos representada, como se suele observar en estos datos (Figura 4.1-E)(Eastman et al., 2018). Por el contrario, y tal como se esperaba, el mismo análisis utilizando los datos del transcriptoma previos (Chávez et al., 2017) no mostraron esta periodicidad de 3-nucleótidos. Por otro lado, las huellas ribosomales se ubican predominantemente en las regiones codificantes, ya que el 93% de las lecturas mapean entre los codones de iniciación y de *stop*, como era de esperar. Este no fue el caso de las lecturas procedentes del estudio de transcriptoma, ya que sólo el 45% de estas lecturas se asignaron a las regiones codificantes, mientras que el resto se asignaron a las regiones no traducidas (UTR) e intergénicas (Figura 4.1-F). Ambas observaciones apoyan que las lecturas del ensayo de huellas ribosomales corresponden efectivamente a transcritos traducidos activamente por polirribosomas. Los resultados de ubicación de las huellas ribosomales secuenciadas indican entonces que el protocolo empleado produjo datos adecuados para su propósito.

A continuación, se utilizó el mismo protocolo de sincronización para obtener proteínas totales de cultivos de epimastigotas en fase G1 y G2 del ciclo celular. Se obtuvieron extractos proteicos para las poblaciones de parásitos enriquecidas en fase G1 (0 hs post HU) y fase S (6 hs post HU).

En este caso se realizaron 2 réplicas independientes por condición, debido limitaciones de financiamiento. Estas poblaciones de parásitos también presentaron enriquecimientos en el entorno del 70% (Figura 4.2- A), como las utilizadas para el Ribo-seq. Las muestras proteicas se procesaron por el método de preparación de muestras asistida por filtro (FASP, Ref Nature Methods) que incluye como paso final la digestión con tripsina y elución de los péptidos obtenidos. Estos péptidos se fraccionaron usando una columna de fase reversa de alto pH y las diferentes fracciones se combinaron en 5 muestras por réplica y por condición, que fueron enviadas al servicio de proteómica donde se procesaron por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En primera instancia, el análisis de componentes principales mostró la correcta separación de los conjuntos de datos por el primer componente que involucra un 66% de la varianza (Figura 4.2-B). Se logró identificar 4.524 grupos de proteínas correspondientes a 4.918 genes codificantes de proteínas del genoma de *T. cruzi* CL-Brener, haplotipo Esmeraldo. Para la identificación de grupos de proteínas de expresión diferencial se consideró aquellas que presentan una magnitud de cambio de 1,5 veces soportada por un FDR menor a 0,05 (Figura 4.2-C). Esto dio lugar a un total de 652 genes regulados a nivel de la abundancia de sus proteínas (P-DEGs, de *Proteomic Differentially Expressed Genes*) en la transición G1/S, de los cuales 204 y 448 presentarían niveles elevados en la fase G1 y S, respectivamente (Figura 4.2-D). Dentro de estos totales se consideraron también a las proteínas que fueron detectadas en ambas réplicas por encima del percentil 25 de nivel de expresión en una etapa del ciclo celular y que no fueron detectadas en ninguna de las réplicas para la otra etapa. Estas proteínas adicionales identificadas como P-DEGs corresponden a 36 para fase G1 y 209 para fase S.

- RESULTADOS -

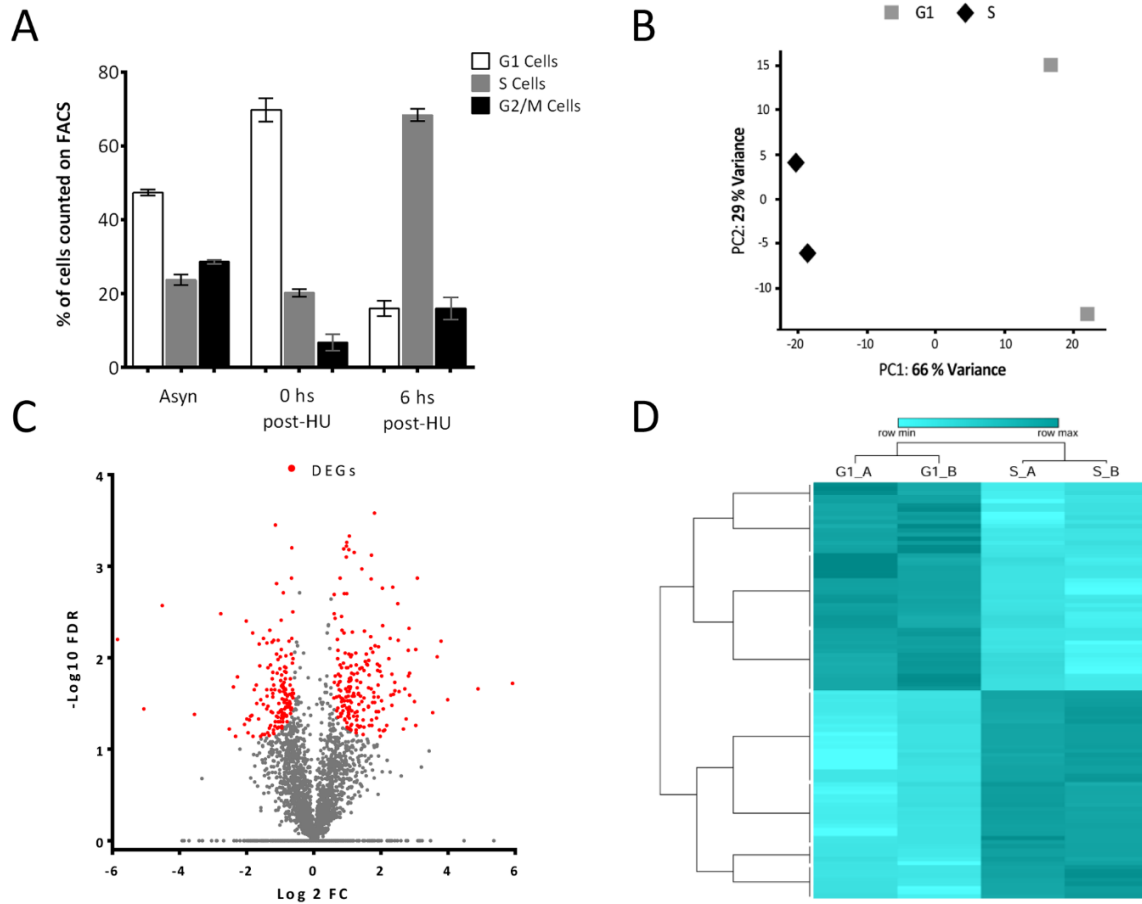


Figura 4.2. Generación y evaluación de datos proteómicos. **A.** Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo para las poblaciones de epimastigotas de *T. cruzi* sincronizadas por Hidroxiurea (HU) para las muestras tomadas para proteómica. La distribución de células en fase G1 (contenido 2C, en blanco), fase S (contenido entre 2-4C, en gris) y en fase G2/M (contenido 4C, en negro) son presentadas para: población asincrónica (Asyn), población enriquecida en fase G1 (0 hs post HU) y una población enriquecida en fase S (6 hs post HU). **B.** Análisis de componentes principales (PCA) para los niveles de expresión proteica (valores de LFQ, *label-free quantification*) por duplicado para la población enriquecida en fase G1 (cuadrados grises), y para la población enriquecida en fase S (diamantes negros). **C.** Gráfico mostrando la distribución para los valores de FDR (*false discovery rate*) de cada gen contra el cambio en la expresión (*Volcano plot*) en la transición G1 a S. Con puntos rojos se representa las proteínas clasificadas como diferencialmente expresadas (DEGs), mostrando cambios de una magnitud mayor a 1.5 soportados por un FDR menor a 0.05 en proteínas representados por al menos 1 péptido único. **D.** Mapa de calor (heatmap) de las 100 proteínas con mayor cambio en la transición G1/S (50 al alza en fase G1 y 50 al alza en fase S) utilizando valores logarítmicos de la cuantificación de la abundancia proteica (log₂ LFQs).

4.2 - Comparación de los cambios transcriptómicos, traductómicos y proteómicos en la transición G1/S del ciclo celular de epimastigotas de *T. cruzi*.

Durante mi investigación de posgrado hemos generado datos transcriptómicos (estudio anterior, Chávez et al., 2017), traductómicos y proteómicos (en esta etapa, Chávez et al., 2021) para las fases G1 y S del ciclo celular de epimastigotas de *T. cruzi* de la cepa TcI. Todos los protocolos de cultivo y sincronización empleados fueron idénticos y se obtuvieron perfiles de distribución en el ciclo celular de las poblaciones altamente reproducibles en los diferentes experimentos. Siendo así, decidimos comparar los resultados globales obtenidos utilizando estas aproximaciones ómicas que apuntan a distintos niveles en el esquema de flujo de la información genética. En primer lugar, evaluamos la sensibilidad de las tres aproximaciones utilizadas, estableciendo umbrales de detección de 15 lecturas normalizadas por gen en los estudios de secuenciación (Smircich et al., 2015) y de 1 péptido único para cada proteína en el estudio proteómico (Benz and Urbaniak, 2019) (Figura 4.3-A). Nuestro estudio transcriptómico reveló la presencia de 9.040 genes expresados por encima del umbral, un 87% de los 10.342 genes codificantes de proteínas en el genoma de *T. cruzi* (Chávez et al., 2017). Esto sugiere que gran parte del genoma los tripanosomátidos se transcribe, al igual que fue visto para otros organismos (Dinger et al., 2009).

Ahora, nuestro estudio a nivel del traductoma identificó 7.248 genes con niveles detectables, representando un 70% de los genes codificantes de *T. cruzi* y un 80% (7.242 de 9.040 genes) de los ARNm transcritos (Figura 4.3). Esta gran proporción de transcritos que también estarían siendo traducidos se ha descrito previamente en un trabajo de nuestro grupo con epimastigotes de *T. cruzi* (Smircich et al., 2015). Resulta confirmatorio de la calidad del traductoma el hecho de que el término más enriquecido entre los 1.600 transcritos detectados en el transcriptoma, pero

- RESULTADOS -

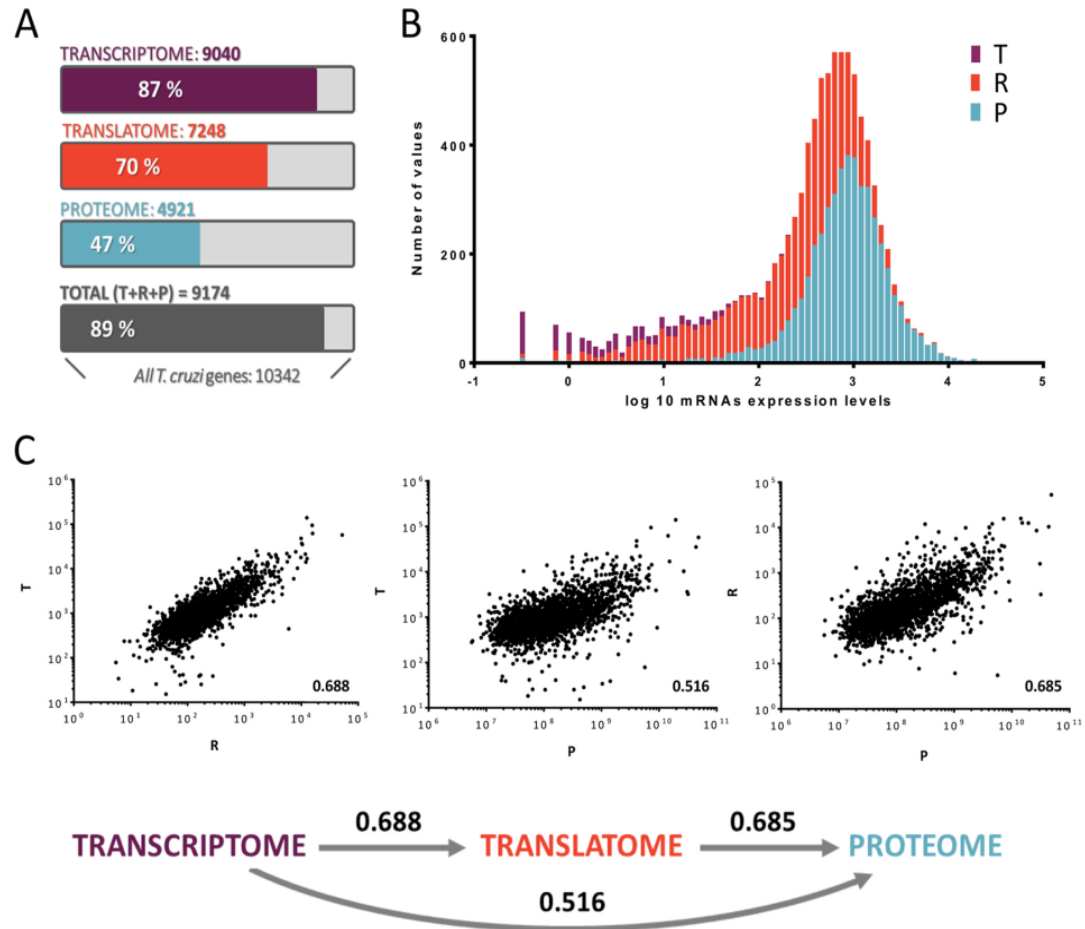


Figure 4.3. Comparación de los diferentes tipos de datos ómicos. **A.** Cantidad de genes detectados en cada experimento, el umbral de detección fue de 15 lecturas normalizadas tanto para el transcriptoma (T, violeta) como para el traductoma (R, rojo), y de al menos 1 péptido único identificado para el proteoma (P, azul). **B.** El histograma presenta los niveles de expresión a nivel del transcriptoma para los genes detectados en cada uno de los 3 sets de datos utilizando los mismos colores que en A. **C.** Gráficos de dispersión para las comparaciones pareadas de los niveles de expresión por gen en cada set de datos. Valores R de correlación de Pearson son presentados con las flechas conectando cada transición en los tres sets de datos.

no en el traductoma, es "pseudogene" (33% de los genes) seguido de términos relacionados con proteínas de superficie (Figura 4.4-A y B). También comparamos estos 1600 genes con un conjunto de genes de interés del trabajo publicado por Smircich y colaboradores (Smircich et al., 2015), los 526 genes presentes sólo en el traductoma del tripomastigota metacíclico y no en el traductoma del epimastigota. Encontramos una coincidencia significativa entre estos 2 grupos de genes (Figura 4.4-C), lo cual presenta el escenario de que parte de los genes que estarían siendo transcritos, pero no traducidos en epimastigotas, corresponden a genes que si se traducen en

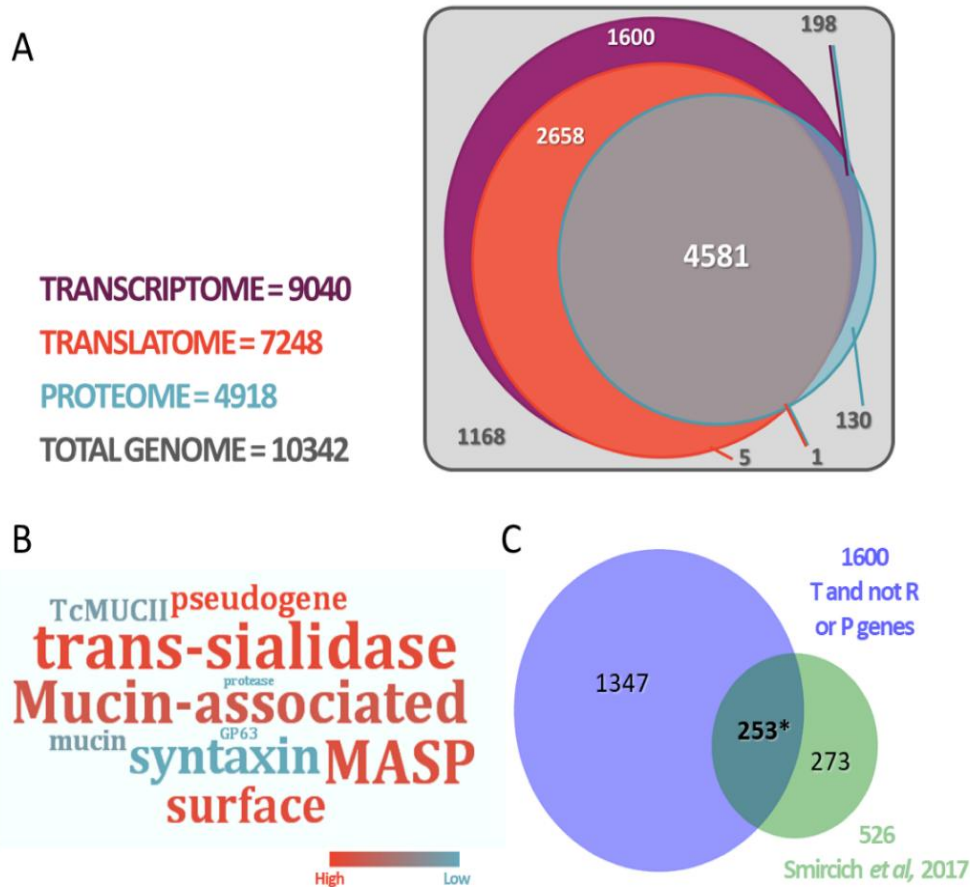


Figure 4.4. Ampliación de la comparación de los conjuntos de datos. **A.** Diagrama de Ven mostrando la intersección entre los genes detectados en nuestros sets de datos. Se consideraron los mismos umbrales mencionados en la figura 4.3 y se utilizó el mismo código de colores. **B.** Análisis de enriquecimiento de términos realizado sobre las descripciones del producto génico para los 1600 genes detectados en el transcriptoma exclusivamente. Se utilizó el software WocEA (Ning et al, 2018) para la representación gráfica en formato de *Word Cloud* de los primeros 10 términos no redundantes, (excluyendo el término *hypothetical gene*). El tamaño de la palabra hace referencia al nivel de enriquecimiento del término y el color representa la significancia en el formato de p-valor ajustado por Bonferroni (*High* = 6.9 E-148, *Low* = 6.2E-3). **C.** Diagrama de Venn que presenta la intersección de los 1600 genes detectados en el transcriptoma y no en traductoma ni proteoma con una lista de 526 genes solo detectados en tripomastigotas metacíclicos comparado a epimastigotas, datos de Smircich y colaboradores, 2015. La intersección de 253 genes observada representa un enriquecimiento estadísticamente significativo evaluado por una prueba de chi cuadrado con corrección de Yates con un p-valor < 0,0001.

tripomastigotas siendo relevantes quizás en el proceso de infección. Ambas observaciones representan una validación de la relevancia biológica de los conjuntos de datos del transcriptoma y el traductoma, ya que los genes relacionados con las fases infectivas se transcriben, pero no se traducen en la fase epimastigota. Por último, se detectaron 4.524 grupos de proteínas a nivel proteómico, que corresponden a 4.918 genes, es decir, el 47% del genoma, lo que representa

una alta cobertura en comparación con estudios anteriores (Figura 4.3)(Parthasarathy and Kalesh, 2020).

Como se podía anticipar, el análisis de proteómica de tipo “*shotgun*” presentó una marcada menor sensibilidad en comparación con los estudios de secuenciación (tanto RNA-seq, como el Ribo-Seq). Se observa que el grupo de genes detectados a nivel proteómico está sesgado hacia transcritos de alta abundancia (Figura 4.3-B), quienes sin embargo representan el 67% (4.918 de 7.248) de los transcritos traducidos (Figura 4.4-A). A pesar de utilizar una de las metodologías más modernas para la obtención de datos proteómicos, estas aproximaciones aún presentan menor sensibilidad comparado a las aproximaciones basadas en la secuenciación de ácidos nucleicos. Por último, las comparaciones pareadas de los valores medios de expresión en G1/S para todos los conjuntos de datos muestran valores de correlación de Pearson superiores a 0,5, indicando una concordancia de expresión génica medida por las tres aproximaciones ómicas (Figura 4.4-A).

Como se esperaba dada la experiencia previa con la metodología de Ribo-Seq, el traductoma demostró ser un mejor indicador de los niveles de proteína que el transcriptoma (0,685 frente a 0,516)(Eastman et al., 2018). Estas últimas dos observaciones confirman y remarcan la validez de la estrategia de Ribo-Seq para detectar los genes que están siendo activamente traducidos. Durante la transición G1/S, el traductoma y el proteoma muestran una regulación claramente mayor de la que se observa en el transcriptoma. Esto se ve, en primer lugar, por un mayor número y proporción de DEGs en relación con los genes analizados en cada caso (transcriptoma: 305/9.087, 3%; traductoma: 1.784/7.530, 24%; proteoma: 653/4.254, 16%) (Figura 4.5-A). En segundo lugar, se observa un rango dinámico mayor en las variaciones de expresión génica para la transición G1/S, presentando una media de cambio absoluto de 0,66, 0,48 y 0,16 para el traductoma, el proteoma y el transcriptoma respectivamente (en escala log2) (Figura 4.5-B)

- RESULTADOS -

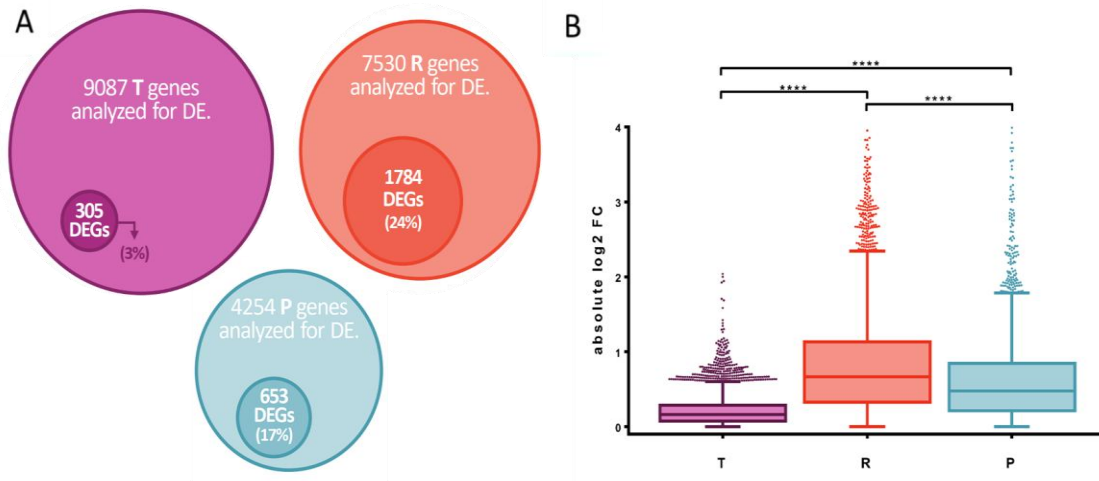


Figure 4.5. Comparación de los cambios observados en la transición G1/S para los 3 sets de datos. A. Representación gráfica de la proporción de genes identificados como diferencialmente expresados versus el número total de genes interrogados en cada set de datos. **B.** Rangos dinámicos de los cambios observados en el transcriptoma, traductoma y proteoma. El valor de cambio G1/S absoluto para cada gen está presentado en escala logarítmica para cada set de datos. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para datos de distribución no-Gaussiana para comparar la media de cada set de datos. Se consideró significancia estadística para p-valores menores a 0.05 (**** representa < 0.0001).

En la Figura 4.6 se presenta una imagen general de los cambios de expresión observados en la transición G1 /S en los tres niveles diferentes de expresión génica analizados. Para este análisis inicial hemos incluido el mayor set de datos con un nivel de confianza mínimo. Definimos 15 lecturas normalizadas por gen para los estudios de secuenciación y al menos 1 valor válido de LFQ en una réplica de cada fase del ciclo para la proteómica. Globalmente, los cambios observados en el traductoma son mayores en número y en rango dinámico que los observados en el transcriptoma (Figura 4.6-A), lo que apoya el hecho de que los epimastigotes de *T. cruzi* dependen de la regulación postranscripcional para lograr una expresión génica diferencial en la transición del ciclo celular G1/S. Asimismo, más de un tercio de los genes representados en la Figura 4.6-A presentan cambios en la transición G1/S ya sea en el traductoma o en el transcriptoma, con un 30% y 3% exclusivos de cada nivel respectivamente. Como era esperable,

- RESULTADOS -

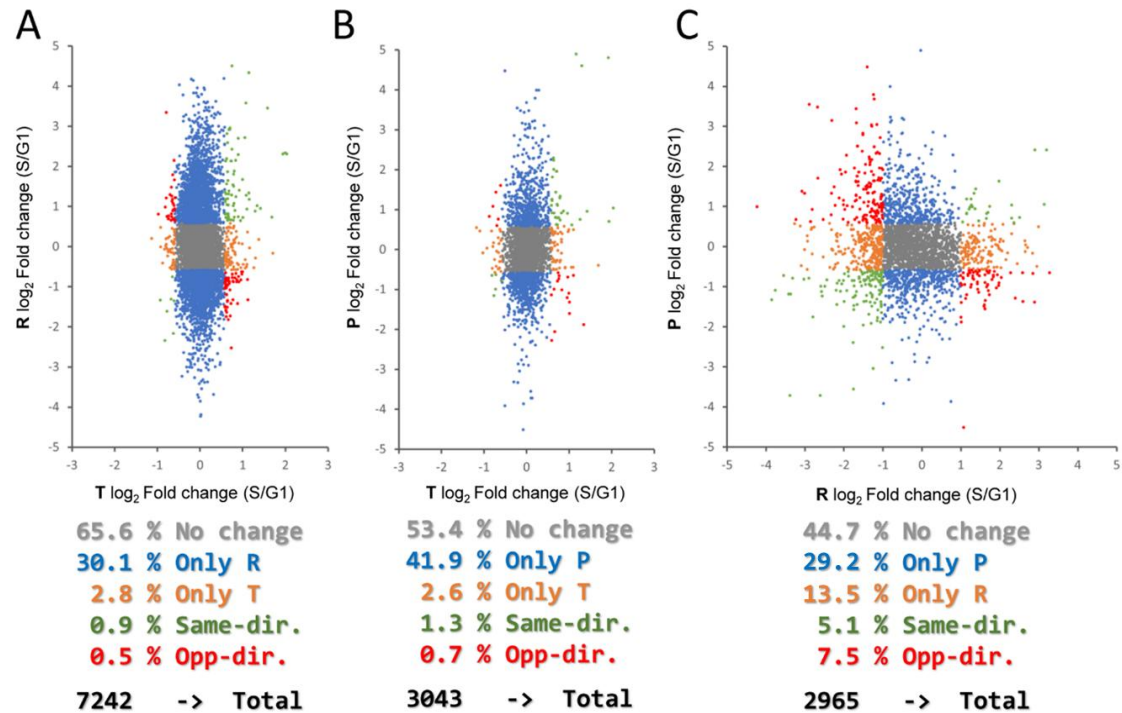


Figure 4.6. Correlaciones pareadas para los cambios S/G1 en los 3 set de datos. Para este análisis, incluimos genes con 15 lecturas normalizadas para los estudios de secuenciación (transcriptoma [T] y traductoma [R]) y al menos 1 valor válido de LFQ para una réplica de cada una de las dos fases del ciclo celular estudiadas para el proteoma (P). El número de genes analizados en cada diagrama resultante del umbral mencionado se presenta en la parte inferior. Los cambios se tomaron de la expresión génica media de las réplicas tanto para R como para P y se presentan en escala logarítmica (log₂). Los genes que muestran cambios están coloreados como se describe debajo de los gráficos; los umbrales considerados son los presentes en análisis posteriores (1,5 veces para T y P, y 2 veces para R). **A.** Traductoma frente a Transcriptoma. **B.** Proteoma frente a Transcriptoma. **C.** Traductoma frente a Proteoma.

la mayoría de los genes modulados en ambos niveles muestran cambios en la misma dirección (un 1% aproximado), mientras que una pequeña fracción de ellos (36 genes, un 0,5%) muestran cambios en direcciones opuestas. Usualmente en los análisis de Ribo-seq, resulta de interés calcular la eficiencia traduccional para cada gen en cada condición estudiada. Este cálculo consiste en la división entre las lecturas normalizadas de huellas ribosomales sobre las lecturas normalizadas del transcriptoma e informa sobre cuanto se está traduciendo un gen particular, independientemente de la abundancia de su ARNm. En otras palabras, el cambio de la eficiencia traduccional de una condición a otra se puede interpretar como cambios en la traducibilidad de los ARNm para ese gen. Dada la particularidad de nuestros datos, donde vemos una modulación excepcionalmente pequeña de la abundancia de los transcritos, esto implicará que los cambios

en la eficiencia traduccional sean prácticamente equivalentes a los cambios en los niveles de huellas u ocupaciones ribosomales, como también se suele referir. Por lo tanto, decidimos no aplicar el cálculo de eficiencia traduccional para nuestros datos de traductoma y utilizar en cambio directamente los niveles de huellas ribosomales para describir las variaciones traduccionales de los genes de *T. cruzi* en la transición G1/S de aquí en adelante.

Como era de esperar, en la comparación de nuestros datos de transcriptoma y proteoma también se puede observar que las variaciones proteómicas son más numerosas y mayores que las del transcriptoma (Figura 4.6-B). Sin embargo, debido a las limitaciones de la sensibilidad en las tecnologías de proteómica actuales, una menor cantidad de genes son identificados en este análisis (3.043), respecto a los observados en la comparación previa (transcriptoma-traductoma). Más de la mitad de estos genes (53%) no cambian sus niveles, ni en el proteoma ni en el transcriptoma. La gran mayoría de los genes modulados muestran cambios sólo en el proteoma (41%), mientras que una fracción menor de genes solo cambian en el transcriptoma (2%), lo cual nuevamente refuerza la relevancia de los mecanismos postranscripcionales para lograr niveles diferenciales de proteínas a partir de ARNm de abundancia similar. Del subconjunto de genes que mostraron cambios en ambos estudios (62), de nuevo la mayoría de estos genes (40 genes, un 1,3%) mostraron cambios concordantes, es decir en la misma dirección.

Por último, al analizar la comparación traductoma-proteoma, observamos la mayor fracción de genes regulados respecto a las 2 comparaciones previas, con un 55% de los genes (del total de 2965 en este caso) que muestran cambios en alguna de las 2 aproximaciones (Figura 4.6-C). De estos genes, un 42% presenta niveles diferenciales en el estudio proteómico y un 26% en el traductoma, mientras que solamente un 13% del total presenta niveles diferenciales en ambos estudios. Si esta última observación se mantuviera para el complemento de genes no detectados a nivel proteico, podría indicar que la regulación de la estabilidad proteica afecta a más genes que el control traduccional de los ARNm durante la transición G1/S del ciclo celular

(considerando los umbrales determinados). A pesar de que nuestra selección de un umbral menor para la expresión diferencial G1/S del proteoma está fundada en la menor capacidad de detección de esta metodología, si equiparamos los umbrales de cambio para ambas estrategias (cambio > 2), se observa que en este caso serían una mayoría de genes regulados en el traductoma (26%) respecto al proteoma (19%). Sin embargo, la diferencia es bastante menor que la observada para el escenario discutido previamente. Está establecido en la literatura que la coordinación de las modificaciones y la estabilidad de las proteínas es un sello molecular de las transiciones del ciclo celular en organismos modelo (Koepp, 2014), incluso siendo esencial para la transición G1/S (Emanuele et al., 2019). En este escenario, la fuerte regulación observada en nuestros datos proteómicos es acorde con lo esperado, aunque aún resta investigar el rol de las modificaciones post-traduccionales. Por otro lado, nos resultó inesperada la observación de un gran número de cambios discordantes o en direcciones opuestas en los perfiles de expresión traductoma-proteoma (222 genes, un 7%), siendo estos más frecuentes que los que se producen de manera concordante o en la misma dirección (150 genes, un 5%). El desacoplamiento de los cambios de expresión génica en estos tipos de experimentos ómicos se ha discutido recientemente en la literatura y ha demostrado ser más común de lo que se había reconocido inicialmente (Tebaldi et al., 2012). Como discutimos más arriba, las diferencias en la magnitud de la modulación en cada conjunto de datos también podrían contribuir a las discordancias observadas (Figura 4.5). Otra alternativa posible reside en las diferencias que puede existir entre la vida media de diferentes grupos de proteínas, pudiendo estas extenderse por más tiempo que lo que se observa en la movilización de los ARNm a los polisomas, lo cual explicaría que las variaciones en las señales observadas en el traductoma no tengan el efecto esperado sobre el proteoma. Esta hipótesis será abordada más adelante en este trabajo.

4.3 - Genes y procesos biológicos regulados diferencialmente en el traductoma y el proteoma durante la transición del ciclo celular del epimastigote G1/S de *T. cruzi*.

Con la finalidad de investigar la función biológica de los genes diferencialmente expresados que identificamos en la transición G₁/S de *T. cruzi*, realizamos un análisis de enriquecimiento de términos ontológicos (Tabla 2; para la lista completa de términos ver la Tabla S3 de Chavez et al., 2021). Para este estudio utilizamos los R-DEGs y P-DEGs, es decir, aquellos genes regulados significativamente y con cambios mayores a 2 para el traductoma y 1,5 para el proteoma (FDR de 0,05 en ambos estudios). Añadimos los DEG transcriptómicos previamente identificados (T-DEGs) a la comparación (Chávez et al., 2017). Vale aclarar que el análisis ontológico en tripanosomátidos debe interpretarse con cautela, debido a que aún las anotaciones de los genomas son sensiblemente menos precisas que en organismos modelo.

Entre las características biológicas más destacadas para los genes con una mayor traducción en G₁ se encuentran las proteínas ribosomales y genes relacionados con la regulación de la traducción. Esto se observa muy claramente para los R-DEGs descritos en el traductoma, aunque también se puede ver en algunos términos enriquecidos en los genes del proteoma. Sin embargo, a nivel del transcriptoma no se observó esta regulación positiva en G₁ de los genes de proteínas ribosomales. Una fuerte regulación traduccional de las proteínas ribosomales se identificó también en el estudio previo de ribonómica de *T. cruzi* realizado en nuestro grupo (Smircich et al., 2015). En este caso se observó la reducción en la traducción de las proteínas ribosomales en la transición del epimastigota replicativo al tripomastigota metacíclico quiescente, donde estos transcriptos se traducen de forma más eficiente en la forma epimastigota.

- RESULTADOS -

Tabla 1. Términos ontológicos enriquecidos para los genes diferenciales de G₁ y S

G ₁ enriched GO terms				S enriched GO terms			
Name	#	FE	p-val	Name	#	FE	p-val
T-DEGs							
monosaccharide binding (MF)	3	56.6	1.8 E-03	DNA binding (MF)	13	6.0	3.0 E-05
ligase activity, forming carbon-nitrogen bonds (MF)	4	17.4	9.8 E-03	DNA replication (BP)	8	11.6	1.4 E-04
nucleoside phosphate catabolic process (BP)	4	18.9	1.7 E-02	chromatin (CC)	5	11.8	6.4 E-03
glycosome (BP)	7	5.9	2.1 E-02	nucleic acid binding (MF)	21	2.5	6.9 E-03
small molecule metabolic process (CC)	11	4.0	2.2 E-02	nucleus (CC)	32	1.9	8.1 E-03
generation of precursor metabolites & energy (BP)	5	10.1	4.0 E-02	protein folding (BP)	8	6.0	2.9 E-02
regulation of macromolecule metabolic process (BP)	11	3.5	7.8 E-02	nucleosome (CC)	4	12.2	3.2 E-02
				chromosomal part (CC)	6	6.0	5.0 E-02
				kinetoplast (CC)	9	3.8	5.7 E-02
R-DEGs							
structural constituent of ribosome (MF)	87	5.3	5.9 E-44	cytoskeleton (CC)	113	2.5	1.8 E-19
translation (BP)	102	3.4	2.0 E-30	ATP binding (MF)	107	2.0	1.8 E-11
ribosome (CC)	97	3.5	6.9 E-30	nucleoside-triphosphatase activity (MF)	72	2.4	1.5 E-10
biosynthetic process (BP)	167	2.2	1.1 E-24	ciliary basal body (CC)	48	3.0	1.7 E-10
protein-containing complex	192	1.9	1.1 E-19	microtubule organizing center (CC)	48	2.9	8.3 E-10
vacuole (CC)	42	3.1	5.9 E-10	microtubule motor activity (MF)	29	4.2	1.4 E-09
oxidoreductase activity (MF)	65	2.3	2.8 E-09	chromosome segregation (BP)	15	6.5	2.1 E-07
mitochondrion (CC)	143	1.5	4.1 E-07	protein binding (MF)	120	1.7	3.7 E-07
small molecule metabolic process (BP)	72	2.0	9.6 E-07	small molecule binding (MF)	119	1.7	3.9 E-07
glycosome (CC)	38	2.5	3.9 E-05	DNA helicase activity (MF)	12	7.2	1.2 E-06
generation of precursor metabolites & energy (BP)	21	3.3	2.8 E-04	DNA repair (BP)	24	3.4	2.9 E-05
glucose metabolic process (BP)	8	6.4	2.9 E-03	cell projection (CC)	130	1.5	8.8 E-05
cytochrome complex (CC)	6	7.5	3.7 E-03	telomere organization (BP)	7	9.5	2.4 E-04
cofactor binding (MF)	30	2.2	1.1 E-02	kinetochore (CC)	10	5.7	3.7 E-04
proteasome complex (CC)	12	3.2	4.4 E-02	axoneme (CC)	40	2.0	3.2 E-03
nucleotide catabolic process (BP)	10	4.0	5.5 E-02	DNA recombination (BP)	9	5.4	6.2 E-03
NADP binding (MF)	7	5.1	5.9 E-02	chromosome (CC)	20	2.5	2.0 E-02
RNA binding (MF)	69	1.5	7.3 E-02	DNA replication (BP)	15	2.8	8.5 E-02
P-DEGs							
translation (BP)	22	3.2	3.6 E-04	nucleosome (CC)	12	7.3	3.7 E-06
structural constituent of ribosome (MF)	14	3.7	5.3 E-03	DNA packaging (BP)	9	7.8	3.9 E-04
ribosome (CC)	18	2.8	1.2 E-02	small molecule metabolic process (BP)	41	2.2	9.2 E-04
calmodulin binding (MF)	4	15.0	1.9 E-02	mitochondrion (CC)	78	1.6	1.1 E-03
translation elongation factor activity (MF)	7	6.1	2.5 E-02	chromatin assembly (BP)	7	9.6	1.2 E-03
entry into host cell (BP)	3	28.1	2.8 E-02	ciliary transition zone (CC)	14	3.9	2.3 E-03
nucleic acid binding (MF)	34	1.9	4.7 E-02	oxidoreductase activity (MF)	33	2.3	2.3 E-03
RNA binding (MF)	23	2.2	6.0 E-02	nucleotide metabolic process (BP)	19	3.2	3.5 E-03
				ciliary plasm (CC)	67	1.7	4.4 E-03
				coenzyme binding (MF)	16	3.1	1.4 E-02
				voltage-gated channel activity (MF)	5	10.3	1.5 E-02
				cofactor binding (MF)	15	2.9	3.7 E-02
				chromosome (CC)	15	2.9	4.7 E-02

El número genes (#), el nivel de enriquecimiento (FE, Fold Enrichment), y el p-valor ajustado por Bonferroni (p-val) se presentan para los términos ontológicos con mejor significancia estadística. El tipo de término ontológico (MF, función molecular; BP, proceso biológico; CC, componente celular) se presenta junto a la descripción del término. La lista de términos presentada fue curada manualmente para disminuir la redundancia. Los términos repetidos dentro de la misma fase celular se marcan en Negrita e Itálica, mientras que los que se repiten en diferentes fases se marcan con Sombreado gris.

Por otro lado, se encontraron funciones celulares relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y la producción de energía sobrerrepresentadas en la etapa G₁, esto se observó tanto para el traductoma como para el transcriptoma. Estas funciones eran de esperarse dado que es en esta etapa donde se produce principalmente el crecimiento celular (Bao et al., 2013; Kaplon et al., 2015). Sin embargo, estos procesos no estaban claramente sobrerrepresentados en los datos proteómicos de G₁. Esta aparente discrepancia podría explicarse en el escenario que, aunque la síntesis de estas enzimas metabólicas disminuya en la fase S, sus vidas medias sean lo suficientemente grandes como para mantener los niveles estables, en el tiempo en que se tomó la muestra. La unión al ARN es una función molecular destacada que se regula también de manera positiva en G₁ es, la cual se observa tanto en los datos del traductoma como en los de proteómica. Recordando la relevancia de los mecanismos de regulación post-transcripcionales en los tripanosomátidos nos resulta de mucho interés el involucramiento de proteínas de unión al ARN y abordaremos este tema más adelante en este trabajo.

Como era de esperar, vías moleculares relacionadas con el metabolismo del ADN están significativamente sobrerrepresentadas en los genes que aumentan en fase S. A pesar de que este proceso está enriquecido en los tres niveles de una manera general, surgieron términos ontológicos ligeramente diferentes en cada uno de los conjuntos de genes. La replicación del ADN se identifica específicamente para los genes regulados en el transcriptoma y en el traductoma, mientras que términos relacionados a vías de reparación y recombinación del ADN son identificados solamente en los genes del traductoma. Mientras tanto, los términos ontológicos observados en el proteoma están más relacionados al empaquetamiento del ADN y al ensamblaje de la cromatina. Esto podría explicarse por el alto nivel de expresión de estos genes, dada la menor sensibilidad del conjunto de datos proteómicos para detectar genes de expresión más baja.

Curiosamente, identificamos términos relacionados con la mitocondria y la cadena respiratoria tanto en genes que aumentan en su expresión en G1 a nivel del traductoma como en genes que se expresan en mayor nivel en la fase S a nivel del proteoma. Esto podría ser explicado por un desfase entre las diferentes etapas de expresión génica en el contexto de que nuestras fases del ciclo corresponden a poblaciones de parásitos con 6 horas de diferencia entre cada colecta. El mecanismo que esta observación podría sugerir sería que estos ARNm se cargan en el compartimento polirribosomal en G1, provocando así un aumento por acumulación de estas proteínas más adelante en la fase S.

Finalmente, también se destacan las funciones celulares relacionadas con la formación del huso mitótico y la organización de los organelos que vemos sobrerrepresentadas en genes con altos niveles en el traductoma en la fase S. Sin embargo, estos procesos no son identificados todavía en el proteoma en la fase S. Coincidentemente, estas funciones biológicas si fueron identificadas en nuestro estudio transcriptómico previo, pero en la etapa G2/M (Chávez et al., 2017). Quizás, estas proteínas podrían estar recién empezando a acumularse en la etapa S para luego lograr un máximo de su abundancia más tarde en la fase G2/M, como se esperaría para el rol que cumplen en el ciclo celular. En este caso nuevamente podríamos estar evidenciando un desfase entre la expresión en el compartimento del traductoma y el proteoma.

4.4 - Análisis de los perfiles de expresión en *T. cruzi* de los genes candidatos a actuar como reguladores del ciclo celular.

En el genoma de *T. cruzi* están codificadas 11 ciclinas y todas ellas son detectadas en nuestros datos del traductoma. Sin embargo, sólo la ciclina 6 (TcCYC6, TcCLB.507089.260) se regula traduccionalmente, aumentando su expresión en la fase S. Esta ciclina está reportada como mitótica y fue caracterizada previamente por Di Renzo y colaboradores (Di Renzo et al., 2016). En ese estudio, informaron que existe una alteración en la transición G1/S en poblaciones de parásitos que sobreexpresan TcCYC6, lo cual deja claro que esta ciclina está involucrada en la regulación del ciclo celular. La modulación de los niveles de TcCYC6 evidenciada por nuestro estudio apoyan las observaciones previas y sugieren que la traducción diferencial del ARNm de TcCYC6 estaría siendo relevante para su expresión diferencial en el ciclo celular. Por otro lado, detectamos en nuestros datos de proteoma sólo 4 de las ciclinas, y solo TcCYC1 (TcCLB.508777.100) está significativamente modulada, mostrando un aumento de sus niveles en el proteoma en la fase S (Figura 4.7-A). Desafortunadamente, no hay más datos en la literatura para la ciclina TcCYC1. Por último, si bien previamente habíamos detectado a las ciclinas TcCYC4 y TcCYC3 reguladas en el transcriptoma, no vimos cambios en el traductoma y tampoco se detectaron péptidos para las mismas, por lo que no pudimos corroborar si los cambios a nivel de sus transcritos se reflejan en la abundancia de proteínas.

Por otro lado, en *T. cruzi* se han identificado análogos de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que son anotados en tripanosomátidos como quinasas relacionadas a *cdc2* (CRKs, por *cdc2-related kinases*). Las 8 CRKs son detectadas en nuestro traductoma, y todas a excepción de una (TcCRK3) en el proteoma. La mayoría de estas no presentan cambios significativos en la transición G1/S, lo cual era esperable ya que su actividad está

- RESULTADOS -

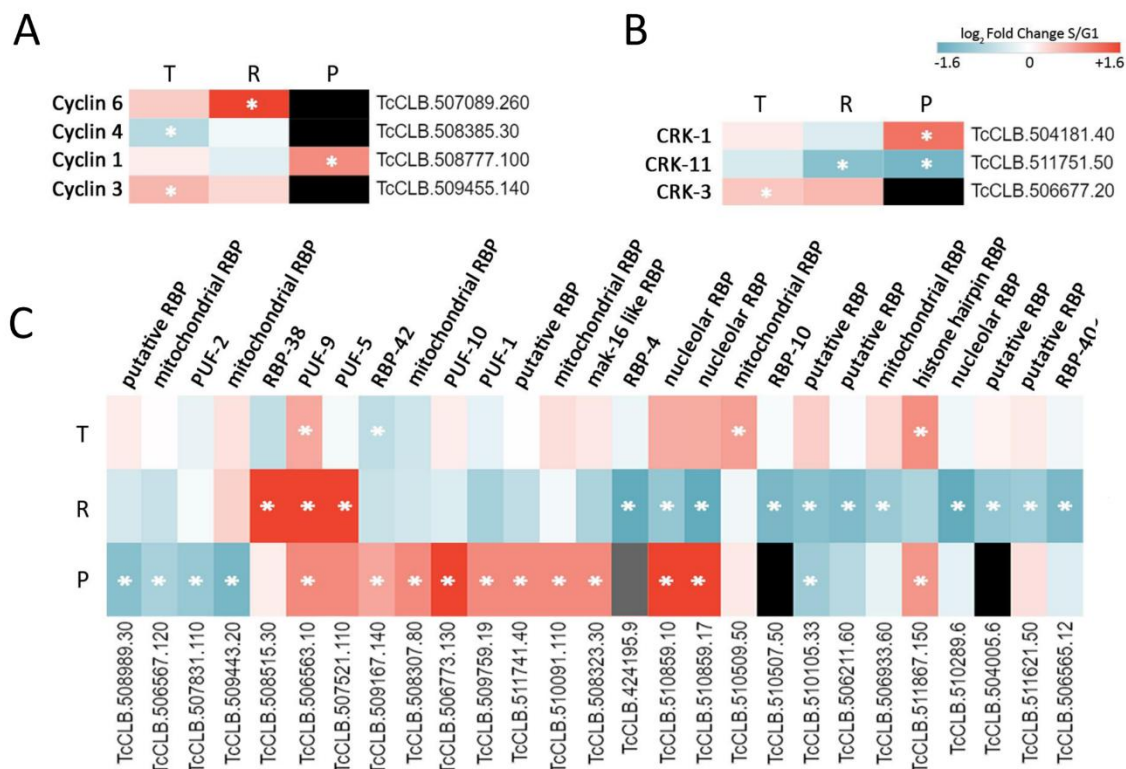


Figure 4.7. Perfiles de expresión para los reguladores putativos del ciclo celular. Se presentan gráficos del tipo *heatmap* para los valores de cambio (en log2) en la transición G1/S para los datos de transcriptoma-traductoma-proteoma (T-R-P) de genes con regulación significativa en alguno de los datasets. **A.** Genes codificantes para las ciclinas. **B.** Genes codificantes para las quinasas dependientes de ciclinas, en tripanosomátidos son las: cdc2-related kinases (CRKs). **C.** Genes codificantes para proteínas de unión al ARN (RNA binding proteins, RBPs). El asterísco blanco indica significancia estadística en la transición G1/S en ese dataset. El sombreado gris indica que no se pudo calcular un cambio con los datos proteómicos. El sombreado negro indica que ese gen no fue detectado en nuestro proteoma en ninguna de las réplicas para ninguna de las condiciones.

fundamentalmente regulada postraduccionalmente por fosforilación (Figura 4.7-B)(Benz and Urbaniak, 2019). Sin embargo, la quinasa TcCRK11 (TcCLB.511751.50) mostró una regulación concordante a la baja en la fase S tanto a nivel de traducción como de proteína, mientras que la TcCRK1 (TcCLB.504181.40) aumenta sus niveles de proteína en la fase S (Figura 4.7-B). TcCRK11 no ha sido estudiada en la literatura, mientras que TcCRK1 es un regulador profundamente estudiado en el ciclo celular de tripanosomátidos. Tres ciclinas putativas de G1, TcCYC2, TcCYC4, TcCYC5, son compañeras de acción confirmadas de TcCRK1 en *T. cruzi* (Gómez et al., 2001). Mientras que la quinasa ortóloga de *T. brucei*, TbCRK1 se ha visto que es esencial para la proliferación celular, actuando en la promoción de la transición G1/S y en la traducción

global mediante la fosforilación de eIF4E4 y PABP1 (An et al., 2018). Otras quinasas usualmente implicadas en el ciclo celular son la *polo-like* quinasa (PLK, TcCLB.506513.160) y la Aurora B quinasa (AUK1, TcCLB.503799.4). Ambas presentan niveles elevados en la fase S, con un aumento de 2 y 18 veces en el traductoma para PLK y AUK1, respectivamente, siendo este último uno de los principales genes regulados por la traducción en nuestro análisis. Aunque la sensibilidad de nuestros datos proteómicos nos impide cuantificar fiablemente su regulación en el ciclo, ambas proteínas sólo se detectan en fase S para ambas replicas (Tabla S2 de Chavez et al., 2021). Estas quinasas tienen un papel central en la duplicación del flagelo y su correcta segregación en la fase G2 (Fassolari and Alonso, 2019; Kurasawa et al., 2020). En consecuencia, ambas alcanzaron su máximo de expresión en G2/M en nuestro anterior análisis del transcriptoma (Chávez et al., 2017); por lo tanto, podríamos especular que sus niveles de proteína podrían aumentar aún más hacia la fase G2.

Otro aspecto que nos interesó abarcar es el análisis de la expresión de proteínas de unión al ARN (RBPs), ya que son candidatos para sustituir a los factores de transcripción en el contexto de la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos. Para eso, buscamos las RBPs expresadas diferencialmente en la transición G1/S en nuestros datos. Observamos que 28 de los 87 genes con una anotación de "unión a ARN" en TriTrypDB (haplotipo CL Brener Esmeraldo-like), hay expresión diferencial en al menos uno de nuestros conjuntos de datos (Figura 4.7-C). Para este grupo de RBPs, que consideramos diferenciales en el ciclo, los niveles de proteínas son frecuentemente independientes de los niveles observados en el traductoma, lo cual sugiere que sufren mecanismos de control complejos. Dentro del grupo de 28 RBPs moduladas, solamente RBP40 ha sido caracterizada en *T. cruzi*, reportándose que se une a regiones ricas en AG en las UTR de los ARNm que codifican proteínas transmembrana, y que sus niveles proteicos son regulados en ciclo de vida del parásito (Guerra-Slompo et al., 2012). Por otro lado, TcPUF9 es la única RBP que muestra una muy clara regulación G1/S, aumentando sus niveles en la fase S en

los tres niveles analizados aquí. Esta proteína de la familia Pumilio ha sido caracterizada en *T. brucei* en el contexto del ciclo celular (Archer et al., 2009), donde se vio que es capaz de estabilizar los ARNm regulados al alza en la fase S. Este hallazgo ha sido confirmado a nivel proteico por Benz y Urbaniak, que también identificaron un sitio de fosforilación en PUF9 modulado a lo largo del ciclo celular (Benz and Urbaniak, 2019). Curiosamente, 5 de las 8 RBPs anotadas en la familia pumilio en *T. cruzi* también muestran regulación del ciclo celular en nuestros datos. Esto estaría de acuerdo con reportes que muestran su participación en la regulación de los procesos del ciclo celular a través de la interacción directa con factores como ciclinas, CDKs, PCNA, SLBP, eIF4E y proteínas ribosomales en organismos modelos (Quenault et al., 2011). Algunos de estos factores también los vemos como genes regulados en nuestros datos sobre la transición G1/S en *T. cruzi* (Tabla S2 de Chavez et al., 2021).

En *Crithidia fasciculata*, un tripanosomátido estrechamente relacionado, se describieron 2 complejos conocidos como *cycling sequence binding proteins* (CSBPI y CSBP II) que participan en la modulación de la abundancia de grupos de transcritos a lo largo del ciclo celular. El complejo CSBPI consta de dos proteínas de unión a ARN con módulos de dedos de zinc, la CSBPA (ZC3H39) y la CSBPB (ZC3H40), cuyos ortólogos en *T. brucei* han demostrado unirse para reprimir a grupos de ARNm en ensayos de tipo “*tethering*” (Erben et al., 2014). Aunque sus niveles en transcriptoma y proteoma permanecen estables a lo largo del ciclo celular (Archer et al., 2011; Crozier et al., 2018), TbZC3H39 presenta un sitio de fosforilación regulado en fase S (Benz and Urbaniak, 2019). La proteína ortóloga de CSBPA en *T. cruzi*, (TcZC3H39, TcCLB.506211.70), ha sido ampliamente caracterizado. Inicialmente se asoció con la respuesta al estrés nutricional, se observó uniéndose a citocromo c oxidasa y a los transcritos de proteínas ribosomales, donde se hipotetiza que genera una disminución de su traducibilidad (Alves et al., 2014). Más recientemente, se implementó CRISPR/Cas9 para generar una línea *knockout* heterocigota para TcZC3H39 y se observaron importantes cambios morfológicos acompañados

de un deterioro en la progresión por el ciclo celular (Romagnoli et al., 2020). No se logró obtener un *knockout* nulo para TcZC3H39, entonces la incapacidad de crecimiento de los parásitos sin esta RBP sugiere que tendría un papel esencial en la proliferación celular. Dado que esta proteína no está regulada en el traductoma ni en el proteoma en la transición G1/S en nuestro estudio de *T. cruzi*, podría especularse con que el de su actividad sería postraducciona, como lo observado para el ortólogo de *T. brucei*. El ortólogo de *T. cruzi* para CBSPB (TcZC3H40, TcCLB.506211.60) no ha sido estudiado previamente, sin embargo, lo detectamos significativamente regulado al alza en G1 en el traductoma y posiblemente en el proteoma, lo cual indica estrategias reguladoras diferentes a las observadas en *T. brucei*.

Finalmente analizamos el comportamiento del complejo CSBP_{II}, está formado por dos RBPs con el dominio C-terminal de PSP-1 (CSBP_{II}_45 y CSBP_{II}_33), cuyas actividades están moduladas por fosforilación (Mitra et al., 2003). CSBP_{II}_45 se une a un motivo de secuencia corto, el cual es necesario para la expresión periódica de los ARNm a lo largo del ciclo celular. Ninguna de las CSBP_{II} ortólogas de *T. brucei* está regulada a nivel proteico en el ciclo celular, aunque su fosforilación sí presenta modulación (Benz and Urbaniak, 2019). En *T. cruzi* hay tres proteínas ortólogas de estas RBPs, dos de ellas están identificadas efectivamente como CSBPs (TcCLB.508541.190, anotada como fosfoproteína RBP33, y TcCLB.506777.50, como fosfoproteína RBP45) y tampoco muestran niveles estables durante la transición G1/S en los tres niveles analizados por nosotros. Mientras tanto, la tercera RBP, a pesar de estar anotada como proteína hipotética (TcCLB.507611.270), aumenta 2,5 veces en la fase S a nivel del traductoma y tiene una tendencia similar en el transcriptoma, donde alcanza su máximo en la fase G2/M. En concordancia, el gen ortólogo de *T. brucei* TcCLB.507611.270 (PDC3) aumenta sus niveles proteicos en la fase S al mismo tiempo presenta un sitio que es fosforilado también en fase S (Benz and Urbaniak, 2019). Desafortunadamente no detectamos esta proteína en nuestros datos de espectrometría de masas.

5 – Identificación de posibles regulones en el ciclo celular de *T. cruzi*.

5.1 - Identificación de conjuntos de genes postranscripcionalmente co-expresados en la transición G1/S del ciclo celular de *T. cruzi*.

En una primera aproximación para identificar posibles regulones postranscripcionales operando en la transición proliferativa G1/S de epimastigotas de *T. cruzi*, agrupamos los 2.757 genes con valores confiables de cambio tanto en el traductoma como en el proteoma (ver 3.7 en Materiales y Métodos). Utilizando una agrupación por correlación de Pearson basada en el cambio logarítmico se obtuvieron 8 grupos de genes con perfiles de regulación similares (Figura 5.1-A). Los 3 principales términos ontológicos no redundantes identificados para cada grupo se presentan en la Figura 5.1-B. Cabe señalar que el análisis ontológico presentado en esta etapa se espera que difiera del que se presentó en la Tabla 2, ya que en este caso participan un subconjunto menor de genes. Una observación inicial es que los grupos 2 y 6 muestran regulación principalmente en el traductoma sin mayores consecuencias en los niveles proteicos. Dentro del grupo 2 se encuentran genes con mayores niveles en el traductoma de fase S que presentan enriquecimiento en términos relacionados con el citoesqueleto y la actividad motora de los microtúbulos, así como con el compartimento flagelar. Estos procesos biológicos apuntan tanto a la reorganización del citoesqueleto que tiene lugar en G2/M como al desarrollo del segundo flagelo que comienza a principios de G2 y tiene lugar en esta etapa antes de que comience la mitosis. Dado que estos genes aumentan sus niveles en el traductoma en la fase S, pero no sus niveles en el proteoma, podría ocurrir que sus ARNm están siendo cargados en el compartimento polirribosomal pero aún no acumulen suficiente producto proteico en este punto. Procesos biológicos similares están enriquecidos en el grupo 3, que muestra niveles elevados tanto en el traductoma como en el proteoma en fase S, lo que indica que este conjunto de genes presentaría un mecanismo y/o cinética de regulación concordante en los 2 sets de datos.

- RESULTADOS -

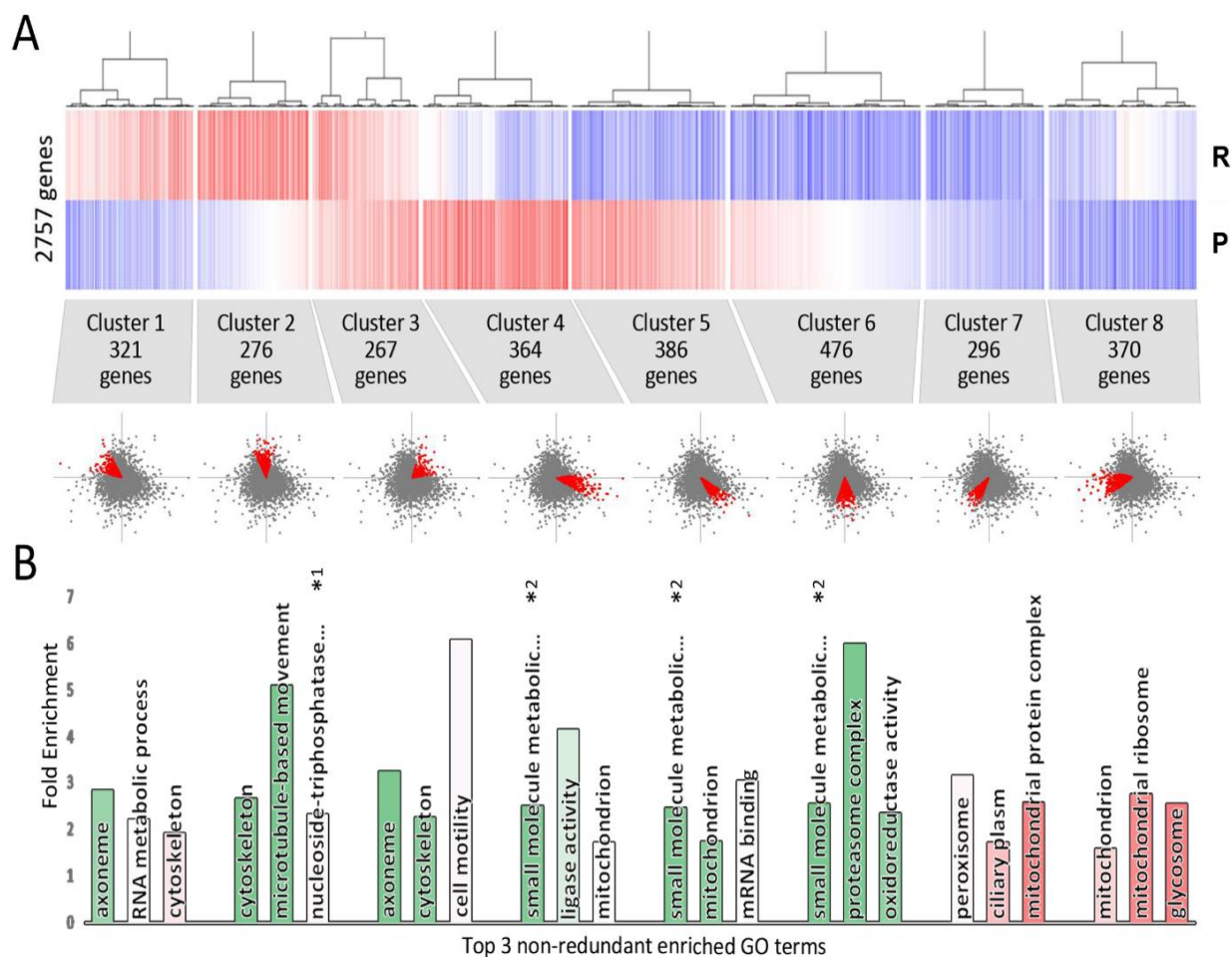


Figure 5.1. Conjuntos putativos de genes co-regulados. A. (Arriba) Agrupamiento por correlación de Pearson para el conjunto de 2757 genes con valores de cambio confiables para el traductoma (R) y el proteoma (P). Rojo y azul representan altos y bajos niveles respectivamente. (Medio) La denominación y el número de genes correspondiente a cada grupo. (Abajo) Representación esquemática de la localización de cada grupo de genes en el diagrama de cambios relativos en cada estudio presentado en la Figura 4.6-C (P: eje Y u ordenada y R: eje X o abscisa). B. Los primeros 3 términos ontológicos no redundantes sobrerrepresentados en cada grupo. La altura del gráfico de barras representa el valor de enriquecimiento mientras que el color representa la significancia estadística (P-valor corregido por Bonferroni) desde 3.5×10^{-28} (verde) hasta 7.7×10^{-22} (rojo). *1, nucleoside triphosphatase activity. *2, small-molecule metabolic process.

A continuación, observamos un grupo de genes con niveles elevados en el traductoma durante G1, pero con niveles estables de abundancia de sus proteínas (grupo 6). En este grupo se enriquecen términos asociados a procesos metabólicos y el consumo de energía, que como ya se ha mencionado son procesos distintivos de la fase G1 del ciclo celular. Nuevamente, podrían existir mecanismos relacionados con la estabilidad de las proteínas traducidas que expliquen la

falta de correlación entre el traductoma y en el proteoma para estos genes en este punto temporal.

Con el fin de investigar si los patrones de regulación R-P de cada grupo podrían estar asociados con el metabolismo del ARNm y de las proteínas involucradas, estimamos la vida media de estas moléculas utilizando datos de *T. brucei* para cultivos asincrónicos (Fadda et al., 2014; Tinti et al., 2019). En la Figura 5.2 se presenta la distribución de los valores de vida media logarítmicos para los genes ortólogos de *T. brucei* identificados en los 8 grupos de la Figura 5.1 (2015 ARNm y 1673 proteínas). Sólo los genes del grupo 1 muestran una vida media baja, es decir, un alto recambio de transcritos y productos proteicos en relación con la media de los 8 grupos. Mientras tanto, para los genes de los clústeres 5 y 6 se ve un aumento de la estabilidad del ARNm en comparación con la media. Cabe destacar que los genes de los grupos 1 y 5 eran justamente los que mostraban una regulación no concordante más evidente entre el traductoma y el proteoma. Esto sugiere la existencia de mecanismos de control traduccionales y postraduccionales complejos para los genes que dan lugar a transcritos y proteínas de alto y bajo recambio. En particular, las proteínas implicadas en la movilidad representadas por los términos ontológicos de axonema y de movilidad celular en los grupos 1, 2 y 3 son significativamente más traducidas en la fase S. Esto se confirma a nivel de proteínas, de forma más evidente en el grupo 3 y para algunos genes del grupo 2. Por último, llama la atención la ausencia de términos relacionados a proteínas ribosomales enriquecidos (visto para 14 genes en la Tabla 2) en los grupos. Esto se debe sus genes están dispersos en 4 de los 8 grupos, lo que sugiere una heterogeneidad en la dinámica de traducción y/o estabilización de estas proteínas.

- RESULTADOS -

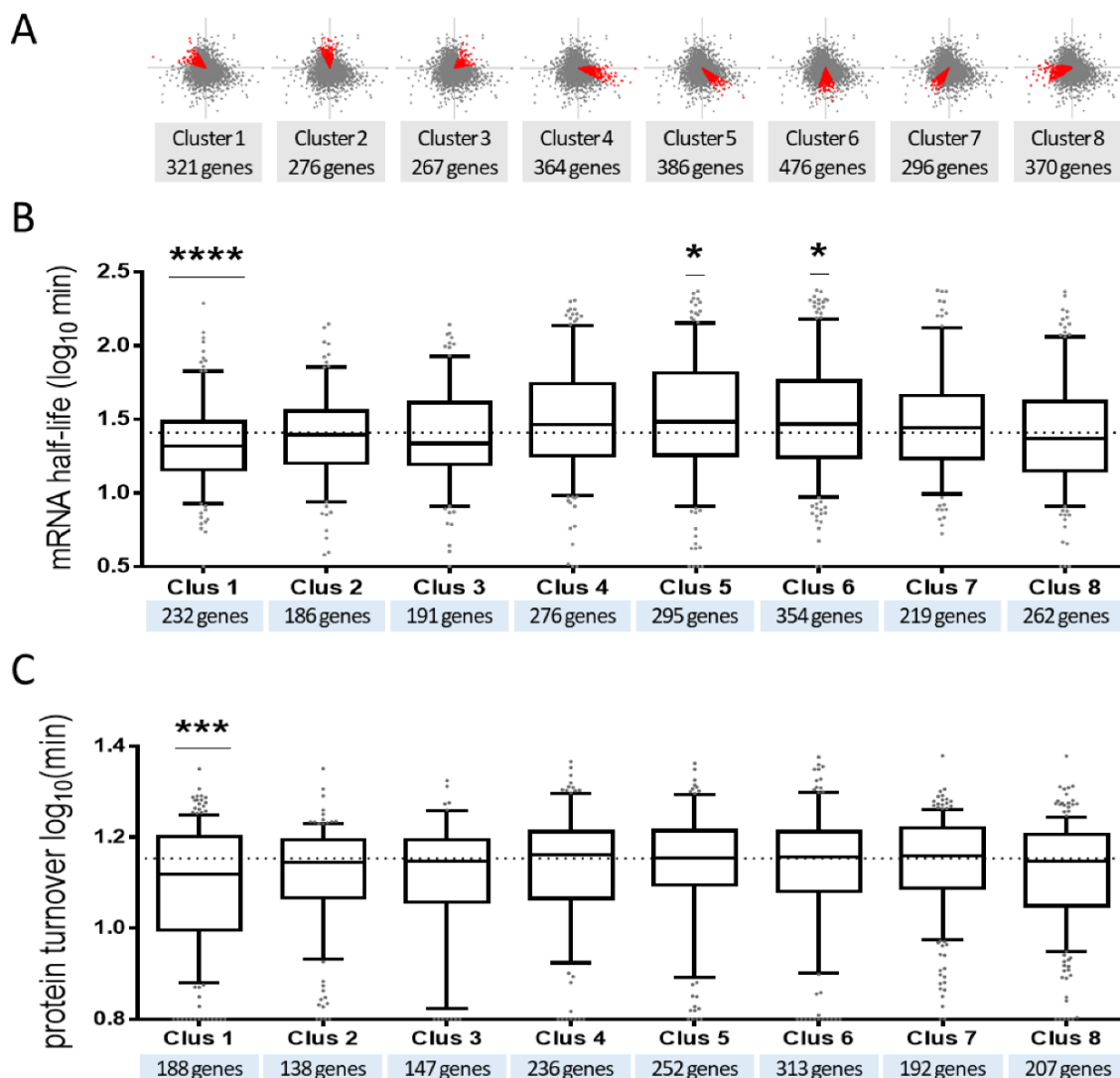
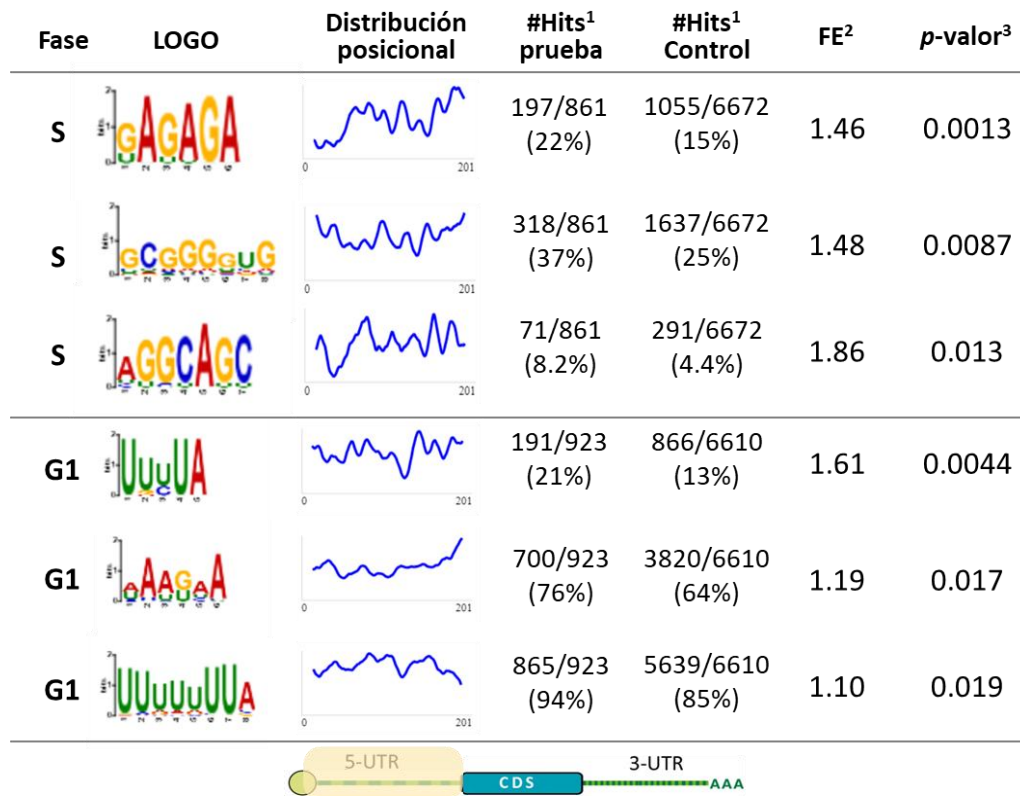


Figure 5.2. Estabilidad de los ARNm y proteínas de cada grupo. **A.** Representación esquemática de la localización de los genes de cada grupo (y el número de genes que lo compone) en el diagrama de cambios relativos en cada estudio presentado en la Figura 4.6-C. **B.** Se utilizó el set de datos de *T. brucei* de Fadda et al. 2014 para la estabilidad de ARNm. Para los ortólogos de los genes de *T. cruzi* en cada grupo se presenta la distribución de los valores de vida media. Se presenta el número de genes con ortólogo y datos disponibles para cada grupo (73% en promedio). **C.** Se utilizaron los datos de *T. brucei* de Tinti et al. 2019 para estimar las vidas medias de las proteínas. Para los ortólogos de los genes de *T. cruzi* en cada grupo se presenta la distribución de los valores de vida media. Se presenta el número de genes con ortólogo y datos disponibles para cada grupo (61% en promedio). Para ambos casos se utilizó una prueba de *t* para datos no gaussianos (corrección de Dunn para pruebas múltiples) para comparar la media de cada grupo con el total de los grupos como control (La media del conjunto se representa con la línea punteada). La significancia estadística se consideró para *p*-valores menores a 0.05 (**** = $p < 0.0001$; *** = $0.0001 < p < 0.001$; * = $0.01 < p < 0.05$)

5.2 - Identificación de motivos de secuencia lineal compartidos en grupos de genes co-regulados.

Para identificar motivos de secuencia lineal en regiones reguladoras de los genes que presentan patrones de co-expresión se analizaron las regiones transcriptas no traducidas (UTRs) de estos genes. Dado que las UTRs de los genes de *T. cruzi* no se han aún determinado con un buen nivel de confianza, utilizamos predicciones bioinformáticas usando la herramienta informática UTRme, diseñada para determinar las regiones UTR de todos los genes de *T. cruzi* utilizando datos de RNA-seq (Radío et al., 2018). Esta permitió determinar las regiones 5' y 3'-UTR de 8034 y 7057 genes de *T. cruzi* respectivamente, utilizando los datos de Li y colaboradores (Li et al., 2016). Encuentran que el tamaño promedio de las regiones 5' y 3'-UTRs es de 196 y 404 nt respectivamente. Tomando estos resultados como referencia, y con la finalidad de abarcar a todos los transcriptos (incluso aquellos en los que no se logró definir una UTR teórica), decidimos definir un largo fijo de UTR: 200 nucleótidos corriente arriba del sitio AUG para obtener las regiones 5'-UTR y 450 nucleótidos corriente abajo del codón de finalización. Utilizando la base de datos de los tripanosomátidos [TriTrypDB](#), descargamos estas regiones para todos los genes de *T. cruzi* (Shanmugasundram et al., 2023). Con estas secuencias se utilizó el servidor MEME que comprende un conjunto de herramientas variadas para búsqueda, análisis y comparación de motivos de secuencia lineales de distinta índole (Bailey et al., 2009). Utilizando la herramienta STREME comenzamos realizando búsquedas para la identificación de motivos de secuencia cortos (entre 5 y 8 nt) para las regiones 5' y 3'-UTRs de los genes de expresión diferencial en el traductoma (923 y 861 genes de fase G1 y S respectivamente) (Bailey, 2021). Se identificaron un total de 8 motivos significativamente enriquecidos en los genes regulados respecto al control (p-valor menor a 0,05) considerando al control como los 7533 genes con datos fiables para el traductoma menos el grupo de prueba. Para las regiones 5'-UTR se obtuvieron 6 motivos en total, 3 para los genes

A



B

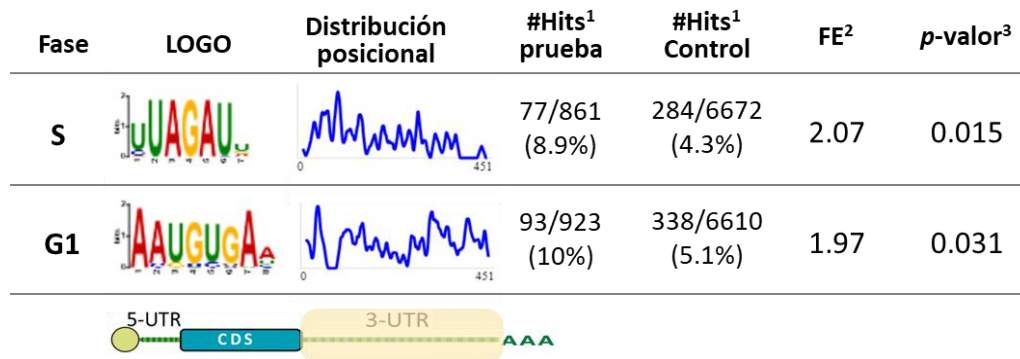


Figura 5.3. Identificación de motivos de secuencia lineal en las regiones UTRs de DEGs del traductoma. Motivos identificados en las regiones UTRs de los genes regulados al alza en el traductoma de la fase G1 y S presentados por su LOGO. Se grafica la distribución posicional del mejor match del motivo a lo largo de las UTRs que la contienen. **A.** Motivos identificados en los 200nt definidos como regiones 5'-UTR de los genes regulados al alza en el traductoma de G1 y S. **B.** Motivos identificados en los 450nt definidos como 3'-UTR de los genes regulados a la alza S y G1. ¹En todos los casos se presenta el número total de genes donde se identifica el motivo en el grupo de prueba y en el grupo control negativo. ²Nivel de enriquecimiento entre ambos grupos (FE, *Fold Enrichment*). ³El p-valor ajustado resultante de una prueba de Fisher. Los datos fueron obtenidos con STREME (MEME suite).

de fase S y 3 para los de fase G1 (Figura 5.3-A). En general se observaron motivos de secuencias simples, con ya sea repetidos homopoliméricos o repetidos de dinucleótidos. Es conocido en los

tripanosomátidos la alta prevalencia de los repetidos simples y de dinucleótidos en las regiones intergénicas (Duhagon et al., 2011), y considerando la estrategia aplicada donde no se conoce exactamente la región UTR de cada gen, podría suceder que haya influencia de regiones intergénicas en nuestro análisis. Al mismo tiempo algunos de los motivos identificados presentan una muy amplia frecuencia en todos los genes, tanto nuestro conjunto de prueba como el grupo control, y en este caso no serían los mejores candidatos para pensar en posibles regulones postranscripcionales. Por otro lado, obtuvimos 1 motivo significativo para cada una de las regiones 3'-UTR de los genes de fase S y G1 (Figura 5.3-B). En estos motivos, encontramos un mayor enriquecimiento al encontrado para los motivos de la 5'-UTR, lo que determinó que continuáramos los estudios enfocándonos en los de la región 3'-UTR. Además, la secuencia del motivo encontrado en fase S, se asemeja a la CCS (del inglés *Cell Cycling Sequence*) que nosotros y otros encontramos en previamente, lo que apoyaría la posibilidad de que ejerza una regulación coordinada entre niveles de regulación génica durante la transición G1/S. Es interesante notar que el motivo más enriquecido en la 5'-UTR de los genes más traducidos en fase S también comparte secuencia con el primero de la 3'UTR. En concordancia, previamente nosotros encontramos que la secuencia CCS se encuentra tanto en la 5'UTR como en la 3'UTR de los genes ortólogos de *T. cruzi* regulados a nivel de abundancia del ARNm durante la transición G1/S (Chavez et al., 2017). También llama la atención que la distribución de los 2 motivos más enriquecidos, g/uAGAGA y u/gUAGAUu/c en 5'-UTR y 3'-UTR de S respectivamente, muestran una distribución posicional enriquecida en la cercanía de la secuencia codificante. Dado que en este caso el criterio de selección de motivos de secuencia es la regulación a nivel traduccional, nos preguntamos si existió una evolución concertada de las señales, de modo que operen a varios niveles de regulación, usando un motivo central y sub-motivos diferentes especializados en mecanismos específicos, como el procesamiento del ARNm, su estabilización y su traducción.

5.3 – Caracterización y evaluación del motivo uUAGAUu detectado en genes de alta traducción en fase S.

En primer lugar, realizamos una comparación del motivo uUAGAUu con una base de datos de referencia de parejas RBP- motivo validadas experimentalmente (Ray et al., 2013). Para esto utilizamos la herramienta TOMTOM de la suite MEME (Gupta et al., 2007). Obtuvimos concordancia con 15 motivos presentes en la base de datos que corresponden a sitios de reconocimiento de RBPs de diferentes modelos como: *D. melanogaster*, *C. elegans*, *P. falciparum*, *H. sapiens* y *T. brucei* (Figura 5.4-A). En la mayoría de los casos, los motivos identificados presentaban enriquecimiento en Adeninas y Uracilos (AREs, de *AU-rich elements*) que suelen ser una señal para la degradación de los transcriptos que los portan en su región 3'-UTR (Chen and Shyu, 1995). Las RBPs que unen a estos motivos suelen estabilizarlos y permitir la traducción de los transcriptos con elementos AREs. Dado que el análisis identificó una RBP de *T. brucei* (Tb927.11.16020) candidata a reconocer el motivo uUAGAUu, decidimos analizar el ortólogo de *T. cruzi* TcCLB.507037.20, una RBP putativa que no ha sido estudiada, y evaluar su perfil de expresión en nuestros conjuntos de datos (Figura 5.4-B). Encontramos que los niveles dicha RBP se mantienen estables en la transición G1/S, tal como se puede ver en nuestros datos ómicos (Tabla S2 de Chavez et al., 2021). Queda por verse si su regulación podría estar vinculada a modificaciones postraduccionales específicas en las etapas del ciclo celular que controlen su actividad. A pesar de que esta es una aproximación muy especulativa, la falta de evidencia de regulación de TcCLB.507037.20 en la transición proliferativa nos llevó a no proseguir su estudio. Luego decidimos evaluar si el motivo uUAGAUu era capaz de modular la expresión génica de los genes que lo presentan en su región 3'-UTR. Para esto, en primer lugar, determinamos el conjunto total de los genes que portan el motivo utilizando la herramienta FIMO (Grant et al., 2011). Determinamos que del total de 361 genes que portan el motivo, 29 de ellos contienen 2

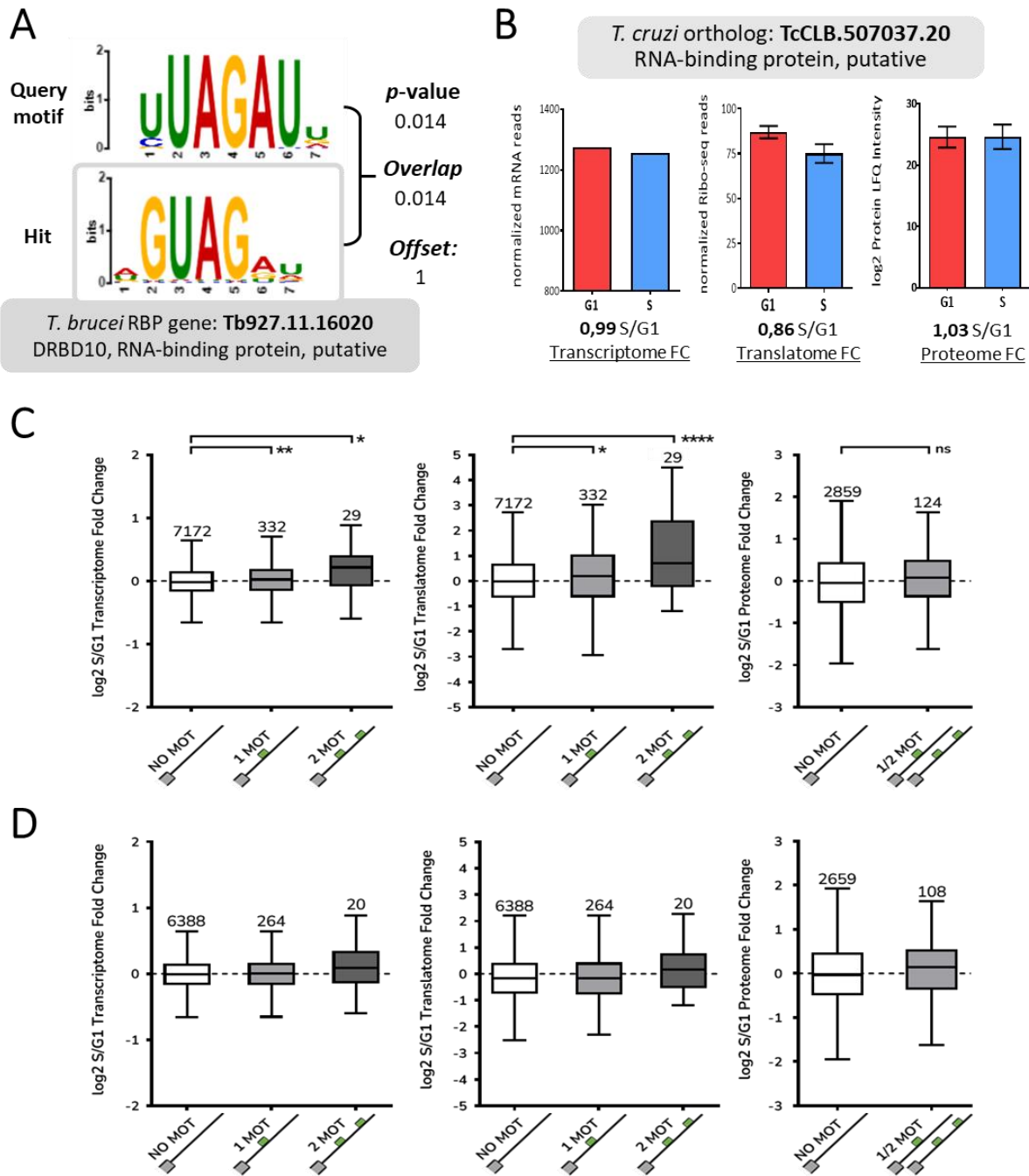


Figure 5.4. Caracterización del motivo UUAGAUU seleccionado **A.** Se presentan la comparación mediante TOMTOM de nuestro motivo con un motivo similar descrito en *T. brucei* unido por la RBP DRBD10. **B.** Identificamos el gen ortólogo a DRBD10 en *T. cruzi* como el primer hit por blast recíproco. Para dicho gen se presentan los valores de expresión en cada uno de los 3 set de datos. Las barras de error indican la media y el error estándar medio. El transcriptoma no presenta réplicas independientes (es un pool de 3 réplicas), **C y D.** Cambio en la expresión en la transición G1/S para nuestros tres conjuntos de datos, donde se presenta la media del cambio en log₂ y la distribución por Tukey de los datos. Se discrimina entre el conjunto de genes control sin presencia del motivo (NO MOT), los genes que presentan solo 1 motivo en su 3'-UTR (1 MOT) y los genes con 2 o más motivos en su 3'-UTR (2 MOT). Arriba de cada caja se presenta el número de genes que conforma cada grupo. El conjunto total de genes con motivo se presenta en **C**, y los genes que presentan el motivo, pero no son parte de los 861 genes regulados en fase S con FC>2 se presenta en **D**. La significancia estadística se constató por una prueba t no-paramétrica (Kruskal-Wallis t-test) usando como referencia el grupo NO MOT. Se aplicó la corrección para múltiples pruebas de Dunn (* - Padj < 0,05) (** - Padj < 0,005) (**** - Padj < 0,00005).

motivos en la región UTR. Observamos que el conjunto de genes que portan el motivo presenta una mayor expresión en fase S a nivel del transcriptoma y el traductoma, con una amplitud aún mayor para los genes que portan 2 motivos (Figura 5.4-C). A pesar de presentar una tendencia similar, el cambio no resultó estadísticamente significativo a nivel del proteoma, tanto cuando se compara con el set de 1 motivo, 2 motivos o el conjunto de genes con 1 y 2 motivos. A modo de control, corroboramos que sucedía cuando considerábamos los genes que presentan motivo, pero que no formaban parte de los 861 genes que inicialmente definimos como genes regulados en el traductoma, es decir que si presentaban cambio no alcanzaban el valor umbral de cambio de 2 en el traductoma o 1,5 en el proteoma (Figura 5.4-D). En este caso se pueden evidenciar tendencias similares a las que se describió para el conjunto total de genes, pero ninguna comparación mostró una diferencia estadísticamente significativa. De esta forma, queda claro el aporte de los genes regulados en la fase S sobre el conjunto total de genes portadores del motivo, a pesar de que constituyen aproximadamente un 20% del total (77/361). Sin embargo, nos resulta interesante destacar que el resto de los genes no regulados presenta una tendencia que muestra una mayor amplitud para genes con 2 motivos en la región 3'-UTR, lo que sugiere que el grupo de genes regulados puede ir más allá de los genes seleccionados con el umbral de cambio en 2.

Con estos datos, decidimos evaluar experimentalmente la capacidad del motivo de provocar cambios en la expresión génica a lo largo del ciclo celular utilizando un sistema reportero. En primer lugar, seleccionamos un gen candidato del cual se va a utilizar la región 3'-UTR como una aproximación natural del motivo trabajando en una UTR nativa de un gen regulado en el ciclo en *T. cruzi*. Seleccionamos al gen *puf9* ya que presenta niveles diferenciales de abundancia en los 3 niveles analizados, con cambios S/G1 mayores a 1.5, 4 y 1.5 en el transcriptoma, traductoma y proteoma respectivamente. Además, *Puf9* es uno de los 25 genes con mayor cambio en el traductoma dentro de los genes que portan motivo. La región 3'-UTR de *puf9* se extiende por

aproximadamente 890 nt (dado lo visto con UTRme, (Radío et al., 2018)) y porta 2 motivos uUAGAUu, uno en la posición 58 y otro en la 623 (Figura 5.5-A). Además, *puf9* ha sido extensivamente estudiada en *T. brucei*, donde se demostró su rol como regulador de transcritos relacionados a la replicación en el ciclo celular, de modo que lo seleccionamos a modo de prueba de concepto (Archer et al., 2009). Para el ensayo reportero emplearemos un sistema dual de luciferasa (donde el plásmido se denomina pTcDUALuc) diseñado por Araujo y colaboradores (Araújo et al., 2011), el cual ha sido utilizado ya en nuestro grupo (Pérez-Díaz et al., 2017). Brevemente, el sistema consiste en un plásmido que expresa un tri-cistrón bajo el control de un promotor ribosomal fuerte. El policistrón se compone de la luciferasa de *Renilla* flanqueada por regiones 5' y 3'-UTR del gen GAPDH, el gen de resistencia a la Neomicina para la selección de transfectantes y el gen de la luciferasa de *Firefly* bajo el control de la 5'-UTR de GAPDH y la región 3'-UTR de interés, que puede ser clonada con las enzimas XhoI y NheI (Figura 5.5-B).

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar la región 3'-UTR completa de *puf9* (890 bases) incorporando también la región intergénica corriente abajo hasta el próximo gen (157 bases) para asegurarnos de incluir las señales para la poli-adenilación/transplicing. Los cebadores tienen agregado en sus extremos los sitios de las enzimas de restricción correspondientes (XhoI, primer directo y NheI, primer reverso) más una serie de bases adicionales para ofrecer un anclaje suficiente a modo de realizar la digestión sobre el producto de PCR. Luego de realizar los ligaciones y transformaciones bacterianas correspondientes se obtuvieron 5 clones que fueron positivos para la incorporación de la UTR de *puf9* en el vector pTcDUALuc. Se evaluó la correcta incorporación del producto de PCR en los plásmidos obtenidos por minipreparación mediante una digestión dual con XhoI/NheI analizada mediante electroforesis en geles de Agarosa. Se constató la liberación de un fragmento del tamaño esperado correspondiente (1053 pb) para todos los clones (Figura 5.5-C).

- RESULTADOS -

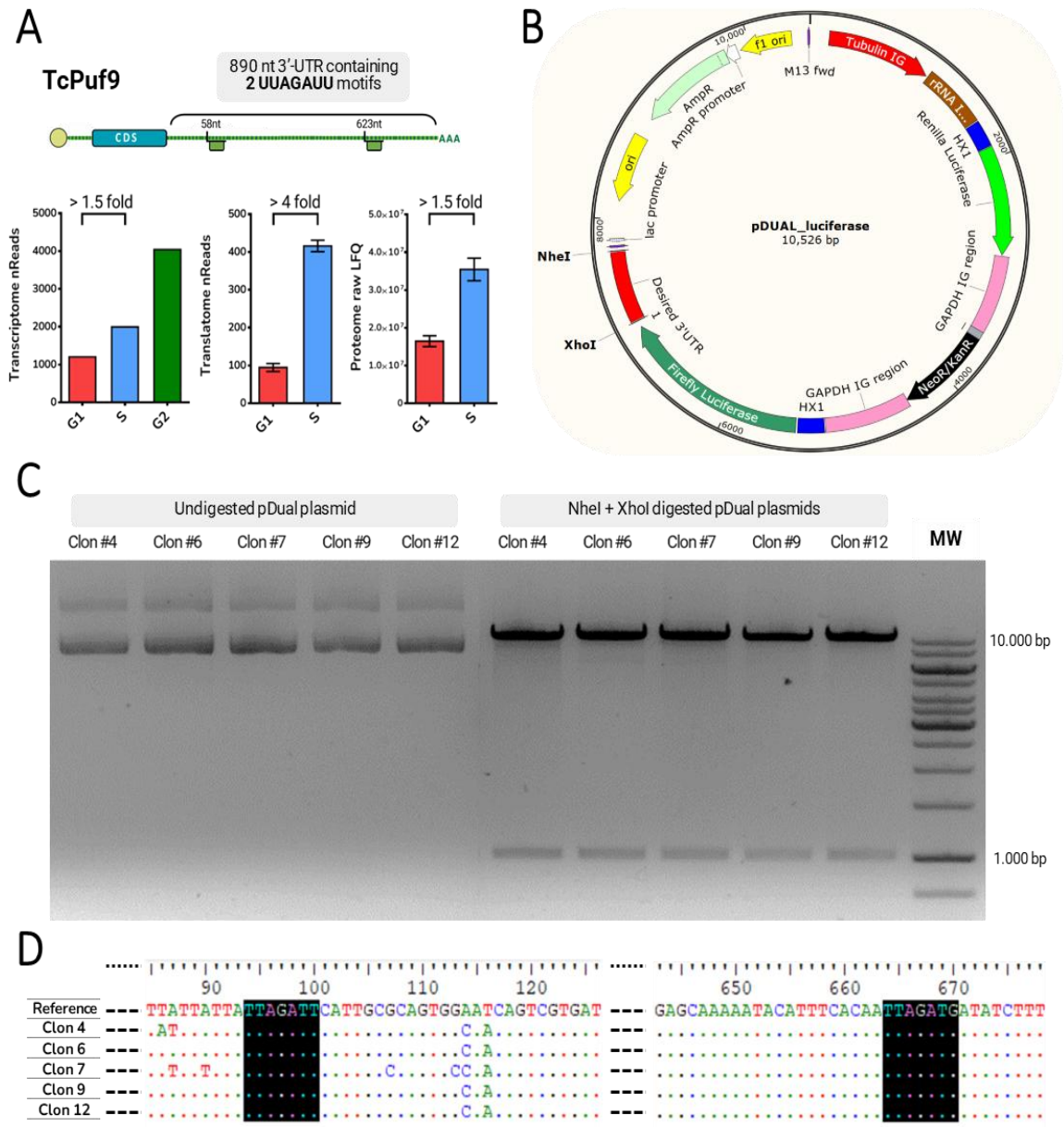


Figura 5.5. Clonado de la 3'-UTR de puf9 en el vector reportero pTcDUALuc. **A.** Esquema de la región 3'-UTR del gen puf9 (arriba). Perfil de expresión del gen puf9 en los 3 set de datos experimentales estudiados (abajo). **B.** Esquema del vector utilizado para la evaluación del control de la 3'-UTR de Puf9 sobre la expresión de la luciferasa *Firefly*. Se puede observar como la luciferasa de *Renilla* se expresa bajo el control de regiones UTR del gen constitutivo GAPDH. **C.** Electroforesis en gel de agarosa para la evaluación de las clonas positivas para la incorporación de la 3'-UTR de puf9 en el vector pDual. **D.** Confirmación de la correcta incorporación de la UTR de puf9 al vector reportero. Se resaltan en negro los 2 sitios donde se encuentran los 2 motivos presentes en puf9.

Por último, se confirmó la identidad de la secuencia clonada por secuenciación de Sanger, evidenciándose la presencia de ambos motivos sin ningún tipo de sustitución o inserción/delección que los afecte (Figura 5.5-D). Esta confirmación es relevante ya que trabajamos con una cepa

(Tcl) que no cuenta con su genoma secuenciado y los análisis se realizaron en la cepa de referencia CL-Brener, por lo que se podría esperar variantes, que suelen ser más frecuentes para las regiones reguladoras respecto a las secuencias codificantes.

Llegado este punto, diseñamos un experimento de transfección de epimastigotas de *T. cruzi* con el plásmido pTcDUALuc_puf9 para su posterior evaluación por luminiscencia. Realizamos la transfección del plásmido en epimastigotas de la cepa Tcl en fase de crecimiento exponencial y a las 48 horas sometimos al cultivo al protocolo de sincronización por Hidroxiurea (Figura 5.6-A). Luego de incubar por 24 horas con HU, se retiró el compuesto por sustitución de medio de cultivo con medio fresco sin compuesto y se colectaron muestras de la población sincronizada. Realizamos tomas de muestra cada 2 horas hasta alcanzar la fase S esperada a las 6 horas y 2 tomas adicionales espaciadas 3 horas entre si hasta alcanzar la fase G2 esperada, a las 12 hora post lavado. En cada toma de muestra se procesó en paralelo una muestra para determinar el tránsito a través del ciclo celular por contenido de ADN por citometría de flujo de y una muestra para realizar un lisado celular y determinar la luminiscencia de los dos genes reporteros codificados por el plásmido transfectado. Confirmamos la distribución esperada de la cantidad de células en cada etapa del ciclo acorde avanzaba nuestro experimento (Figura 5.6-B). El máximo de células en G1 se observó a las 0 horas (55%), para la fase S fue a las 6 horas (51%) y el máximo observado para G2 fue a las 12 horas (38%). Vale aclarar que la eficiencia de la sincronización es menor a la que usualmente observamos al realizar sincronizaciones mediante Hidroxiurea (70% en cada etapa) y evaluación por tinción de ADN con Ioduro de Propidio. Esto puede deberse al uso de una tinción con Vibrant Dye Cycle Orange™ en lugar de Ioduro de Propidio, que fue seleccionada porque permite analizar células vivas eliminando el paso de fijación de los parásitos y permite un monitoreo casi en tiempo real del tránsito del ciclo celular.

- RESULTADOS -

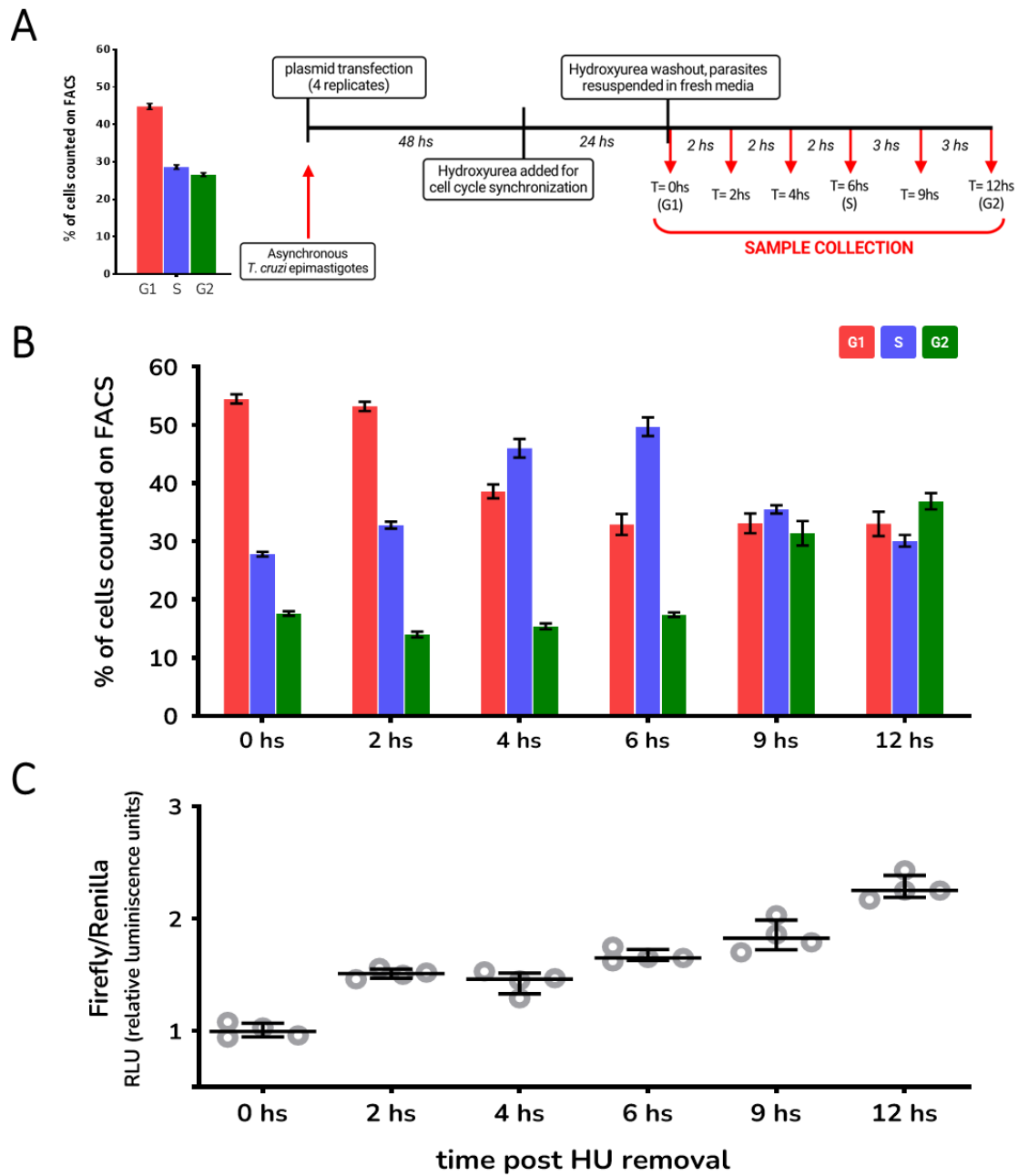


Figura 5.6. Evaluación de la actividad de la influencia de la 3'-UTR de *puf9* dirigiendo la expresión de un sistema reportero. **A.** Esquema mostrando el diseño del experimento reportero. A la izquierda se muestran los conteos de células en cada etapa del ciclo celular determinado por contenido de ADN en citometría de flujo para una población asincrónica previo a la introducción del plásmido. Luego se esquematizan los tiempos en los cuales se ejecutó el ensayo de reportero. **B.** Conteos de células en cada etapa del ciclo celular determinado por contenido de ADN en citometría de flujo para cada muestra colectada en el ensayo de reporteros. En este caso se utilizó vibrant dye cycle para la tinción del ADN. **C.** Valores de luminiscencia obtenidos para cada muestra colectada en el ensayo de reporteros. El valor obtenido para la luciferasa de Firefly bajo el control de la UTR de *puf9* se normalizó en cada muestra al valor obtenido para Renilla, mientras que luego se normalizó la muestra de 0hs a un valor de 1 y se evaluó las siguientes horas respecto a esta referencia.

A pesar de que esta tinción permitió confirmar el progreso del ciclo celular, dio lugar a picos con mayor dispersión para cada subgrupo de las poblaciones, lo cual evidenciamos por obtener coeficientes de variación mayores. Creemos que esto contribuye a que obtengamos valores menores de enriquecimiento en el análisis de citometría. Sin embargo, también notamos que los enriquecimientos que vemos son cada vez menores a medida pasan las horas y las células avanzan en el ciclo celular. Más allá de que sabemos que la sincronía obtenida por la detención del ciclo por Hidroxiurea solo se mantiene por el primer ciclo luego de la liberación de la droga (Chávez et al., 2017), en este caso no logramos ver un enriquecimiento significativo de las células en la fase G2. Esto podría explicarse porque los parásitos en nuestro experimento de sistema reportero son sometidos al tratamiento con Hidroxiurea a las 48 horas de haber sido sometidos a la transfección por electroporación, un proceso que induce estrés celular, y por lo tanto no se encuentran en las condiciones de crecimiento óptimas para el iniciar una sincronización. De todas maneras, entendemos que, siendo una transfección transitoria sin selección, la mejor opción era realizar la sincronización en un tiempo no mayor a las 48 horas para evitar perder la expresión del plásmido reportero. Aun así, el diseño experimental permitió detectar la actividad de ambas enzimas luciferasa muy por encima de los límites de sensibilidad del sistema. Para la cuantificación del ensayo, en primer lugar, normalizamos la expresión de la luciferasa de *Firefly* contra la luciferasa de *Renilla*, que están bajo el control de la 3'-UTR de *puf9* y del gen *GAPDH* respectivamente. Luego relativizamos la expresión de la Luciferasa *Firefly* en cada tiempo con el valor de la población colectada al tiempo 0 horas (G1). De esta forma, observamos que la actividad del sistema reportero aumenta a lo largo avanza el ciclo celular, obteniendo una expresión casi 2 veces mayor en el pico de fase S (6 horas), la cual continúa aumentando hasta alcanzar un máximo a las 12 horas (G2) (Figura 5.6-C). Esto es concordante con lo observado para la expresión de *puf9* endógeno en el ciclo celular, corroborando lo visto a nivel proteico y del traductoma hasta la fase S, y también nuestro dato previo del transcriptoma que mostraba que el ARNm de *puf9* continuaba aumentando sus niveles hacia la fase G2/M del ciclo celular

- RESULTADOS -

(Chávez et al., 2017). Con estos resultados podemos decir que la región 3'-UTR de puf9 es capaz de guiar la expresión del sistema reportero acorde a lo esperado respecto a nuestros datos ómicos. Nos resta realizar confirmaciones de que este efecto observado se pierda en ensayos que incorporen mutantes de pérdida de los motivos para poder determinar si este efecto es causado por la presencia de estos reguladores en *CIS* particularmente.

DISCUSIÓN

La ausencia de control a nivel del inicio transcripcional lleva a que los niveles postranscripcionales de la expresión génica sean los determinantes de la expresión diferencial en *T. cruzi* (Clayton, 2019; De Gaudenzi et al., 2011). Aunque es esperable que la estabilidad y traducibilidad de los transcritos junto al recambio proteico sean factores clave en la expresión génica, los regulones postranscripcionales siguen siendo en su mayoría desconocidos. Aquí presentamos el análisis del traductoma y el proteoma de epimastigotas de *T. cruzi* sincronizados en las fases G1 y S, con el objetivo de descubrir mecanismos postranscripcionales que controlan la expresión génica en esta transición determinante para la decisión de comenzar la proliferación. Dado que el ciclo celular del parásito presenta muchas características divergentes del huésped humano (Calderano et al., 2011a; Chávez et al., 2017; Ploubidou et al., 1999), la identificación de características distintivas puede dar lugar a nuevos blancos moleculares para el diseño racional de fármacos. Dado que estudiamos el estadio epimastigota, un estadio no infeccioso que se desarrolla en el insecto vector, nuestras observaciones no serían directamente aplicables al tratamiento de pacientes, pero podrían ser útiles para las estrategias de control del parásito en poblaciones del vector. No obstante, la forma epimastigote se ha utilizado ampliamente como modelo del parásito para estudiar diferentes aspectos biológicos, incluida la sensibilidad a los fármacos quimioterapéuticos. Al mismo tiempo, es probable que los mecanismos moleculares y la maquinaria de replicación celular sean notablemente similares entre los distintos estadios de desarrollo, mientras que las diferencias más llamativas podrían darse en el punto de control de la replicación.

La decisión de estudiar el ciclo celular de esta forma del parásito se basó en la necesidad de disponer de un gran número de poblaciones de parásitos enriquecidas en el ciclo celular para

metodologías de alto rendimiento (Aramayo and Polymenis, 2017), algo que es imposible de conseguir trabajando en el estadio amastigota, (exclusivamente intracelular) hoy en día. Utilizando el protocolo de sincronización con hidroxurea que mayor eficiencia ha mostrado para *T. cruzi* en la literatura (Galanti et al., 1994; Potenza et al., 2012), conseguimos enriquecimientos del 70% en las poblaciones de parásitos en las fases G1 y S. Esto necesariamente implica que la expresión génica diferencial se verá subestimada en nuestros cálculos, dado que la presencia de ese 30% de fases del ciclo celular no deseadas (Figura 4.1-A y Figura 4.2-A). Además, se sabe que el tratamiento con hidroxurea, así como los demás protocolos de sincronización celular, causan efectos que no se verían en el ciclo celular natural no perturbado; por lo tanto, el significado biológico de algunos procesos debería validarse utilizando métodos alternativos. Por otro lado, a pesar de las limitaciones reconocidas de la sincronización con hidroxurea, actualmente es el único método que produce una cantidad de parásitos adecuada para la metodología de Ribosome profiling (10^9 parásitos por réplica) (Aramayo and Polymenis, 2017). De este modo, consideramos que el protocolo de sincronización con hidroxurea hace posible el descubrimiento de patrones globales de expresión génica postranscripcional de la expresión génica en *T. cruzi* y se espera que la mayoría de los cambios observados también ocurran en el ciclo celular no perturbado (Archer et al., 2011).

Mediante *ribosome profiling* y proteómica, obtuvimos más de 31 millones de lecturas de secuenciación y más de 500.000 espectros MS/MS analizados, los cuales representan 7.248 transcritos y 4.524 grupos de proteínas (correspondientes a 4.918 genes), respectivamente. Se obtuvieron rendimientos similares a los previamente reportados en *ribosome profilings* de tripanosomátidos aplicando el umbral para la detección (7.873 transcritos en *T. cruzi* (Smircich et al., 2015), 7.792 (Jensen et al., 2014) y 7.773 (Vasquez et al., 2014) transcritos en *T. brucei*). Asimismo, estudios proteómicos recientes de *T. cruzi* detectaron 4.060 (Amorim et al., 2017) y 4.205 (Lucena et al., 2019) grupos de proteínas, mientras que un estudio del ciclo celular de *T.*

brucei detectó 4.629 grupos de proteínas (Benz and Urbaniak, 2019). Por lo tanto, los resultados de estos dos enfoques ómicos que llevamos a cabo para investigar la transición replicativa G1/S en el ciclo celular de *T. cruzi* son coherentes con el rendimiento actual de estas metodologías aplicadas a tripanosomátidos en cuanto a sensibilidad y cobertura. A pesar del fraccionamiento aplicado a las preparaciones peptídicas para disminuir la complejidad de la muestra, la menor sensibilidad obtenida en nuestros datos proteómicos en relación con el *ribosome profiling* (Ingolia et al., 2009; Koch et al., 2014), dio lugar a que las proteínas detectadas se correspondan con transcritos de media y alta expresión. No obstante, identificamos péptidos para el 67% de los transcritos detectados en el traductoma, mientras que estudios similares evaluando traductoma y proteoma simultáneamente en tres líneas celulares humanas diferentes detectaron el 54% de los transcritos traducidos a nivel proteico (Chang et al., 2014).

Los estudios comparativos entre los 3 niveles de regulación analizados muestran una correlación estadística entre ellos y una mejor correlación entre los niveles del traductoma y la abundancia de proteínas (traductoma/proteoma) en comparación con los niveles de transcripción (tanto transcriptoma/traductoma como transcriptoma/proteoma). Este hallazgo concuerda con lo observado en diversos estudios de *ribosome profiling* llevados a cabo en varios organismos modelo, de acuerdo con lo revisados por Eastman y colaboradores (Eastman et al., 2018). Se observó una regulación más amplia en la transición G1/S para los niveles del traductoma y el proteoma en comparación con el transcriptoma, lo que se aprecia tanto en un mayor número de DEGs detectados (T-DEGs, 305; R-DEGs, 1.784; P-DEGs, 653), como en el mayor rango dinámico de variación observado (Figura 4.5). Esto apoya la relevancia de los pasos de control de la expresión génica que tienen lugar luego de que se logran niveles estables de ARNm, como se esperaba. La modulación ligeramente mayor observada en el traductoma comparado al proteoma puede estar influenciada, sin embargo, por sesgos metodológicos; por tanto, la verdadera relevancia de esta diferencia es aún incierta. De hecho, se espera que las

comparaciones transgenómicas se vean afectadas por sesgos intrínsecos de cada una de las diferentes metodologías. A pesar de que los tres conjuntos de datos se han generado utilizando protocolos de sincronización idénticos y reproducibles dentro de cada set de datos y también procedimientos de cultivo idénticos para cada set de datos en paralelo, estamos contrastado experimentos independientes; por lo tanto, no se pueden descartar los efectos de lote (*batch effect*).

El control traduccional de ARNm específicos a lo largo del ciclo celular se ha descrito recientemente en organismos modelo empleando la estrategia de *ribosome profiling* (ver revisión al respecto, Aramayo and Polymenis, 2017). Comparando el número de transcriptos regulados por la traducción en cada modelo, *T. cruzi* muestra un número bruto mayor de genes regulados y una mayor proporción de genes regulados/detectados (1.784/7.530, 24%) que la levadura *S. cerevisiae* (55/3.291, 1,7%) (Blank et al., 2017) y que las líneas celulares humanas (353/10.841, 3,2%)(Stumpf et al., 2013). Además, de los 55 transcritos que muestran niveles diferenciales en el traductoma de la levadura, Aramayo y Polymenis (Aramayo and Polymenis, 2017) sugieren que sólo 17 de ellos muestran de forma fiable cambios en la eficiencia traduccional. En este sentido, los tripanosomátidos parecen estar lejos de este escenario, y esto es esperable dado que la mayor parte del genoma se transcribe a una tasa basal básicamente similar y, por lo tanto, dependen de la regulación postranscripcional para alcanzar niveles diferenciales en sus ARNm y proteínas. Para obtener más conclusiones de las comparaciones de estos conjuntos de datos, sería necesario realizar un metaanálisis exhaustivo a partir de los datos brutos, ya que la heterogeneidad de los métodos aplicados para la selección/inducción de poblaciones de ciclos celulares sincrónicos y la naturaleza de la expresión génica y los mecanismos reguladores en los tripanosomátidos hacen que estas comparaciones se realicen con cautela.

El estudio proteómico del ciclo celular realizado por el grupo del Dr. Urbaniak en *T. brucei* destacó la relevancia de la fosforilación diferencial, ya que mostró cambios más generalizados que la abundancia de proteínas a lo largo de 6 puntos temporales del ciclo celular obtenidos por elutriación (Benz and Urbaniak, 2019). Aunque nosotros no estudiamos la fosforilación, en nuestro estudio proteómico pudimos identificar 408 proteínas diferenciales, un número comparable al determinado por Benz y Urbaniak (443 grupos de proteínas). A pesar de las diferencias metodológicas entre estos estudios, términos ontológicos comunes relacionados al ciclo celular están enriquecidos en las proteínas reguladas de ambos, lo que apoya la significación biológica de nuestros datos. Tanto los genes identificados como regulados en la transición G1/S en el traductoma, como los del proteoma están enriquecidos en vías bien conocidas del ciclo celular y procesos asociados. Nuestro análisis revela que la regulación traduccional magnifica diferencias que ya estaban presentes a nivel del transcriptoma en varios procesos biológicos, como ser la biología del glicosoma y las funciones relacionadas al metabolismo energético para los genes regulados en G1. Debido al mayor control traduccional respecto al transcriptoma, los R-DEG no sólo incluyen, sino que amplían la lista de genes observados en los T-DEG (Figura 6.1-A). Además, la regulación traduccional provoca una mayor magnitud de cambio que lo observado a nivel de las abundancias de los transcriptos (Figura 6.1-B). Un fenómeno similar se observa para los genes regulados en la fase S, particularmente para las vías de replicación del ADN; sin embargo, en este caso, un conjunto diferente de genes está implicado en el transcriptoma y el traductoma (Figura 6.1). No obstante, la regulación traduccional actúa principalmente sobre genes que no están regulados a nivel del ARNm, muchos de los cuales no se habían estudiado previamente durante el ciclo celular de los tripanosomátidos. Por ejemplo, se observó regulación traduccional en los genes regulados en G1, como las proteínas ribosomales y otros genes implicados en la traducción, el proteosoma y los procesos mitocondriales y oxidativos; asimismo, los genes regulados por la fase S incluyen genes relacionados con la biología de los microtúbulos, el citoesqueleto y la motilidad, así como

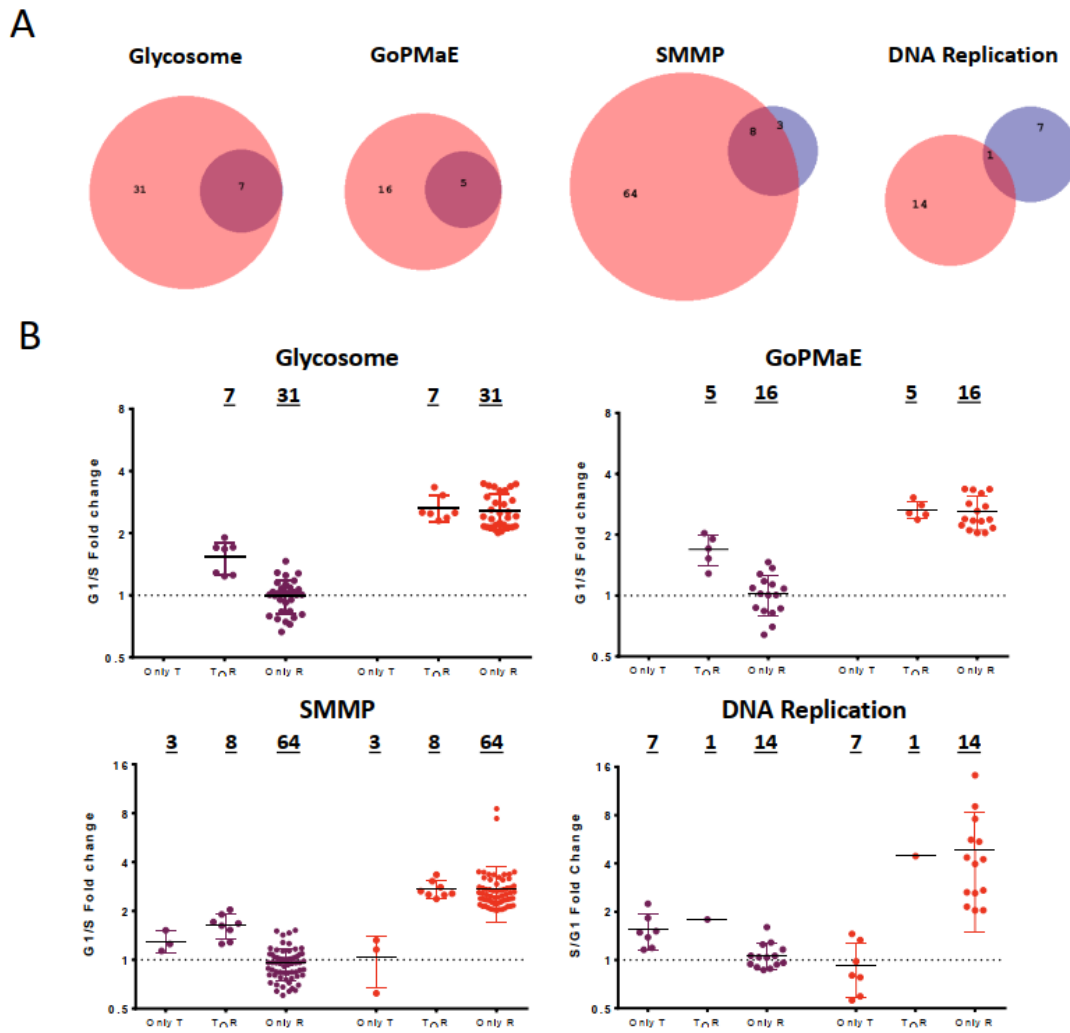


Figura 6.1. Evaluación de los términos ontológicos repetidos en genes del transcriptoma y del traductoma. A. Diagramas de Venn representando los genes comprendidos en los principales términos GO compartidos entre el Transcriptoma (Violeta) y el Traductoma (Rojo). **B.** Gráficos de columna con detalle de los puntos individuales para los cambios en la transición G1/S en el Transcriptoma (Violeta) y el Traductoma (Rojo) para los genes resultantes de los diagramas de Venn de la parte A. (**Only T**, genes exclusivamente detectados en el Transcriptoma; **Only R**, genes exclusivamente detectados en el Traductoma; **T/R**, genes presentes en ambos estudios). El número de genes se presenta sobre cada columna. *GoPMaE* - Generation of precursor metabolites and energy. *SMMP* - Small molecule metabolic process.

el complejo cinetocoro. Curiosamente, nuestro estudio encontró ciertos grupos de genes regulados traducionalmente, como las proteínas ribosomales, que también se han identificado bajo regulación traduccional en el ciclo de vida del parásito (Smircich et al., 2015). Esto sugiere que ciertos grupos de genes podrían estar regulados principalmente en niveles de expresión génica específicos, independientemente del proceso biológico estudiado. La comparación del traductoma y el proteoma muestra que la mayoría de los genes regulados están relacionados

con diferentes procesos celulares en cada conjunto de datos, aunque algunos términos ontológicos están regulados en ambos, como los términos relacionados con la traducción y también proteínas de unión al ARN y relacionadas al mantenimiento del cromosoma (Figura 6.2). Es interesante que los genes relacionados con los procesos de la fase G2/M aumenten los niveles de traducción en la fase S sin cambios en la abundancia de proteínas. Dado que generalmente se acepta que la traducción global disminuye hacia la fase G2/M del ciclo celular (Fan and Penman, 1970; Stumpf et al., 2013), es tentador proponer que las proteínas relacionadas con G2/M necesitan ser producidas en la fase S mientras la maquinaria de traducción está todavía muy activa, pero podrían acumularse o estabilizarse luego en la fase G2/M. Para probar esta hipótesis se necesitaría estudiar más puntos temporales. En general, los resultados sugieren que la expresión génica diferencial de términos génicos relacionados se consigue de múltiples maneras para definir con precisión la coordinación temporal de los procesos biológicos a lo largo del ciclo celular.

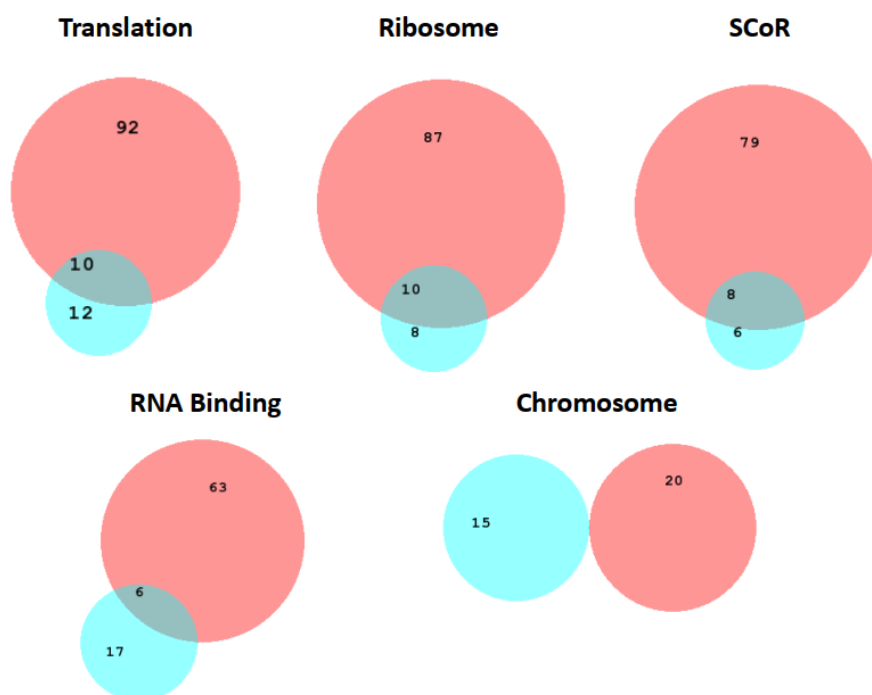


Figura 6.2. Evaluación de los términos ontológicos repetidos en el proteoma y el transcriptoma. A. Diagramas de Venn representando los genes comprendidos en los principales términos GO compartidos entre el Proteoma (Verde) y el Transcriptoma (Rojo). **SCoR** – Structural Component of Ribosomes.

Debido a la importancia de la identificación de los reguladores del ciclo celular de *T. cruzi*, investigamos la modulación de ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas, RBPs y quinasas del ciclo celular conocidas. Globalmente, sólo TcCYC6 está regulada traduccionalmente, mientras que sólo cambia el nivel de proteína de TcCYC1 (de las 4 detectadas), lo que sugiere que el control de las ciclinas podría ser principalmente postraduccional. Como era de esperar, nuestros datos indican que las CRKs están probablemente reguladas por modificaciones postraduccionales, pero CRK1, CRK3 y CRK11 están controladas, al menos parcialmente, a nivel traduccional y de abundancia proteica. Además, encontramos 5 proteínas Pumilio que están reguladas en el traductoma o el proteoma durante la transición del ciclo celular G1/S, incluyendo el ortólogo de la bien caracterizada Puf9 en *T. brucei* (Archer et al., 2009). Por último, algunos de los ortólogos de *T. cruzi* de los componentes de los complejos CSBP se identifican en el traductoma y 2 de ellos experimentan una regulación traduccional en G1/S no descrita en otros tripanosomas, cuya dirección concuerda con el conocimiento previo de su expresión. Cabe destacar que nuestros hallazgos apoyan invariablemente el conocimiento existente sobre los reguladores putativos del ciclo celular de los tripanosomátidos (TcCYC6, CRK1, PLK1, AUK1, PUF9, TcZC3H40, PDC3 [Id: TcCLB.507611.270]), lo que refuerza la robustez de nuestro enfoque ómico y la utilidad del análisis del traductoma para el estudio de genes poco expresados. Además, proporcionamos un apoyo novedoso para las proteínas candidatas no estudiadas de *T. cruzi* TcCYC1; CRK11; PUF1, -2, -5, y -10; y CSPBII.

En este estudio, también nos propusimos identificar posibles regulones postranscripcionales que operan en la transición epimastigote G1/S; por tanto, inicialmente nos centramos en los genes co-expresados. Sobre la base de la expresión en el traductoma y el proteoma, se identificaron ocho grupos de genes con perfiles de expresión similares, que cambiaban en un único conjunto de datos (sólo traductoma, o sólo proteoma) o en ambos niveles a la vez. La

comparación de la concordancia de los cambios en el traductoma y el proteoma muestra tanto agrupaciones que incluyen genes regulados en la misma dirección como genes regulados en direcciones opuestas. La complejidad reguladora revelada por este análisis sugiere que pueden ser necesarios diversos mecanismos coordinados para definir el nivel preciso de grupos específicos de proteínas en diferentes momentos del ciclo celular. De hecho, muy recientemente un estudio que aplicó secuenciación en célula única en *T. brucei* (*Single-cell transcriptomics*) (Briggs et al., 2023), identificó también la falta de concordancia entre los genes descritos como periódicos a nivel del transcripto y las proteínas vistas con niveles modulados en el ciclo (Benz and Urbaniak, 2019). Recientemente se ha publicado un estudio del proteoma y fosfo-proteoma del ciclo celular de *T. cruzi* (Santos Júnior et al., 2021). En concordancia con nuestros hallazgos, los autores observan una modulación similar de las proteínas ribosomales, la actividad oxidorreductasa y las vías metabólicas. Las diferencias empíricas y en el análisis de los datos impiden realizar más comparaciones con nuestros hallazgos, por lo que sería necesario un nuevo análisis más exhaustivo de los datos para extraer conclusiones significativas.

La búsqueda de motivos de secuencia lineal conservados en las regiones UTRs de los transcriptos de DEGs es una estrategia utilizada para analizar la modulación coordinada de un conjunto de genes que presentan perfiles similares de expresión. Estos motivos serían reconocidos por proteínas reguladoras constituyendo así un regulón postranscripcional (De Gaudenzi et al., 2011). Por este motivo realizamos búsquedas en las regiones 5' como 3'-UTR de diversos grupos de genes con perfiles de expresión similares. En resultados que no se presentaron aquí se realizaron búsquedas sobre los 8 agrupamientos de genes presentados en la Figura 5.1, pero no encontramos motivos con enriquecimientos significativos y composición de la secuencia relevantes para continuar estudiando. Por otro lado, se obtuvieron motivos potencialmente relevantes al analizar los grupos de genes regulados en el traductoma (Figura 5.2). En particular nos llamó la atención el motivo de 7 nucleótidos uUAGAUu encontrado en un

subgrupo de genes que aumentan su traducción en la fase S del ciclo celular y decidimos profundizar su caracterización. Para este motivo describimos una RBP como hipotética compañera de acción dada la capacidad de su proteína ortóloga en *T. brucei* de unirse a una secuencia nucleotídica similar, pero no encontramos expresión periódica de la misma en nuestros datos. Esto no descarta que la actividad de la RBP sea periódicamente regulada post-traduccionalmente, pero dirige el estudio hacia objetivos no comprendidos originalmente en este proyecto. Si bien no se incluye en esta tesis, continuamos el estudio de las RBPs de expresión periódica que identificamos reguladas en la transición G1/S de *T. cruzi*.

Por otro lado, corroboramos un aumento tanto en los niveles de transcripto como en el traductoma para el conjunto total de genes que portan el motivo uUAGAUu en su región 3'-UTR. Este aumento fue mayor para aquellos genes con múltiples motivos en su región reguladora. Aplicamos la estrategia de ensayo reportero clonando la región 3'-UTR del gen *puf9* corriente debajo del gen de *Firefly* luciferasa en un plásmido dual diseñado para evaluar este tipo de reguladores en CIS en *T. cruzi*. El ensayo se realizó tomando muestras a medida transcurre el ciclo sincrónico luego de un arresto por incubación con Hidroxiurea. Así, observamos un incremento gradual de la actividad *Firefly* luciferasa bajo el control de la UTR de *puf9* comparado al gen reportero control de la *Renilla* luciferasa que se encuentra flanqueado por regiones UTR de un gen control GAPDH. Este ensayo constituye una evaluación preliminar prometedora del rol del motivo uUAGAUu en la expresión de los genes que lo portan. También constituye una confirmación de la utilidad de la estrategia experimental empleada que tiene la ventaja de ser sensible y rápida por solo requerir transfección transiente. Para confirmar que el fenotipo observado se debe a la presencia de el/los motivos en la región UTR debemos llevar adelante mutagénesis para eliminar o modificar los motivos del plásmido reportero y corroborar que el efecto observado se pierda. De ser así, nuestros resultados identificarían al primer motivo en

regiones UTR regulador de la traducción de los transcritos que lo portan en el ciclo celular de los tripanosomátidos y uno de los pocos motivos de secuencia reguladores de la traducción en estos organismos.

En conclusión, hemos generado un amplio conjunto de datos que descubren tres niveles de expresión génica, una comparación que no se había realizado antes en tripanosomátidos. De hecho, muy pocos estudios similares se publican actualmente en la literatura en otros organismos; por lo tanto, todavía se requiere más investigación para comprender la complejidad de la regulación, que parece ser incluso anterógrada con frecuencia. Nuestro estudio revela una mayor regulación traduccional durante la transición G1/S del ciclo celular de *T. cruzi* en comparación con humanos y levaduras (Blank et al., 2017; Stumpf et al., 2013) y revela el control traduccional de algunos reguladores clave del ciclo celular, apoyando la importancia de este nivel de control para la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos. Además, identificamos grupos de genes correlacionados a niveles específicos cuyas redes reguladoras podrían estudiarse con mayor profundidad para definir regulones postranscripcionales y su mecanismo de control. En este sentido fuimos capaces de identificar un motivo en las regiones 3'-UTR de un conjunto de 361 genes que podría coordinar un aumento en los niveles de traducción de estos genes en fase S. Finalmente, proporcionamos un nuevo conjunto de datos de referencia disponible para interrogatorios específicos de genes y de biología de sistemas.

PERSPECTIVAS

Estudiar de cambios observados en ciclo celular no perturbado y en estadio amastigota

Ciclo no perturbado.

El estudio ómico del ciclo celular luego de la sincronización con hidroxurea tiene la limitación de que provoca algunos cambios en la expresión génica que no se observan en el ciclo proliferativo natural o no perturbado. Para corregir este sesgo, existe la alternativa de la elutriación, aunque no proporcionaría el número de células adecuada para el *ribosome profiling* por el protocolo que realizamos nosotros. Además, no contamos en nuestro país con un equipo para realizarla, y en consultas sobre equipos disponibles en otros países ha surgido el impedimento de utilizar los equipos utilizados para *T. brucei* (Archer et al., 2011) en *T. cruzi* por el riesgo biológico.

Realizar secuenciación *Single-Cell* de cultivos asincrónicos de epimastigotas o amastigotas y comparar los resultados con los DEGs que obtuvimos con nuestra aproximación de sincronización proporcionaría una idea de cuan similares son los cambios observados en ciclo celular natural o no perturbado. Esto se deba a que los estudios de RNA-seq de células únicas indican que la fase del ciclo celular la variable fundamental que explica los agrupamientos que se observan en las representaciones de reducción dimensional (UMAP) y pseudo-timing (Briggs et al., 2023). Si bien esta aproximación solo informa los niveles de transcritos y también tiene sus propios sesgos, resulta interesante para contrastar con nuestros hallazgos de ribonómica y la proteómica. Por otro lado, muy recientemente se desarrolló la metodología de *Single-Cell* ribosome profiling (Ozadam et al., 2023; VanInsberghe et al., 2021; Zeng et al., 2023), que también encuentra al ciclo celular como la variable que explica mayormente la diversidad traduccional en una población proliferativa, la cual sería especialmente adecuada para aplicar a nuestras interrogantes sobre la modulación de la expresión génica en el ciclo celular de amastigotas.

Además de la validación de nuestros hallazgos a nivel ómico, podrían también realizarse estrategias de validación para genes individuales, por aproximaciones de biología celular y molecular más tradicionales, en poblaciones replicativas no perturbadas. Para esto podría aplicarse detección de síntesis proteica *de novo* con puro-PLA (Chin and Lécuyer, 2021) en conjunto con tinción de contenido de ADN para distinguir las fases del ciclo celular seguido de análisis cuantitativo por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (y co-inmunotinción con marcadores de fase del ciclo). También podrían separarse las tres fases del ciclo celular por clasificación celular asistida por fluorescencia previo al análisis de puro-PLA. En todos los casos, deberíamos generar un anticuerpo monoclonal para las proteínas seleccionadas.

Estadío Amastigota

Extender el estudio de la regulación de la expresión génica en la proliferación de amastigotas, sería de relevancia dado que es el estadio replicativo en el huésped, y es responsable de mantener latente la infección en la etapa crónica. No se ha conseguido sincronizar con hidroxiurea amastigotas intracelulares, y no hay publicaciones con resultados de sincronización en cultivos axénicos de amastigotas, que conforman un modelo que se puede crecer en condiciones de laboratorio, es decir, fuera del ambiente intracelular. Esta última aproximación nos permitiría realizar análisis equivalentes a los que realizamos ya en epimastigotas, considerando que se compartirán las limitaciones de trabajar con un ciclo perturbado por la acción de la Hidroxiurea.

Como se indicó en el apartado anterior, también las aproximaciones de secuenciación de células única a nivel de RNA-seq o ribo-seq para estudios a nivel ómico, así como las de Puro-PLA para genes individuales permitirán investigar la regulación génica postranscripcional en amastigotas intracelulares asincrónicos.

Caracterización de regulones postranscripcionales en el ciclo celular

Extender el análisis sobre el rol del motivo uUAGAUu en el ciclo celular de *T. cruzi*

En primer lugar, como se mencionó previamente, deberían realizarse mutaciones para eliminar/modificar el motivo dentro de la UTR de *puf9* a modo de corroborar que el fenotipo observado es causado específicamente por el motivo dentro de la región UTR. Podrían también extenderse el mismo estudio a otros genes con este motivo o adicionar motivos a UTRs que carecen del mismo. Sería interesante realizar experimentos de captura de RBPs compañera de acción del motivo inmovilizando ARN sintético biotinilado que funcionen a nivel de carnada en una fase estacionaria (streptoavidina-sefarosa) y a capturar proteínas con afinidad incubando con un extracto proteico de epimastigotas de *T. cruzi*. Existen también aproximaciones *in vivo* para la captura de interactores como ensayos de biotinilación por proximidad con biotín ligasas (BirA, APEX, dCas13) fusionadas a dominios de unión al ARN clonados en la misma UTR en regiones cercanas al motivo (Ramanathan et al., 2019).

Por último, se podría investigar la presencia y ubicación del motivo y de variantes del mismo, extendiendo el análisis a diversas cepas de *T. cruzi* y a otros tripanosomátidos utilizando genes de función conservada en estos organismos. De esta forma evaluaremos la conservación del motivo en los tripanosomátidos, lo cual constituye un argumento a favor de su relevancia funcional.

Caracterización de RBPs candidatas a regular la expresión génica en el ciclo celular de *T. cruzi*

Se está llevando adelante la edición genómica mediante CRISPR-Cas9 sobre dos genes seleccionados a partir de los resultados de nuestro estudio. El objetivo es generar etiquetas N-terminal endógenas (FLAG) en estas RBPs de interés para facilitar su caracterización. Una vez obtenido los parásitos editados, se utilizan anticuerpos específicos contra la etiqueta incorporada

para capturar la RBP y los ARNm asociados a ella aplicar metodologías de secuenciación para determinar el conjunto de ARNm que serían blancos para las mismas. De esta forma podría también buscarse motivos de secuencia por enriquecimiento en las regiones UTRs de los transcriptos blancos. Al mismo tiempo se puede caracterizar con mayor profundidad a la RBP, identificando su localización subcelular, sus niveles de abundancia proteica a lo largo del ciclo celular y el ciclo de vida del parásito. También podría estudiarse la movilización a polisomas en diferentes etapas del ciclo. Esto se realiza utilizando ultracentrifugación en gradientes de sacarosa donde verificamos si la RBP podría estar involucrada en la regulación a nivel traduccional de sus blancos.

REFERENCIAS

- Adl, S.M., Bass, D., Lane, C.E., Lukeš, J., Schoch, C.L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M.W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A.A., Hoppenrath, M., James, T.Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D.J.G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., Mann, D.G., Massana, R., Mitchell, E.A.D., Morrow, C., Park, J.S., Pawlowski, J.W., Powell, M.J., Richter, D.J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F.W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., Zhang, Q., 2019. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 66, 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- Agabian, N., 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157–1160. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90674-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90674-4)
- Alberts, B., Herald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J., Hunt, T., 1983. *Molecular Biology of the Cell*, 7th Edition. Chapter 17. W. W. Norton & Co.
- Alves, L.R., Oliveira, C., Goldenberg, S., 2015. Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol* 15, 104. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0436-2>
- Alves, L.R., Oliveira, C., Mörking, P.A., Kessler, R.L., Martins, S.T., Romagnoli, B.A.A., Marchini, F.K., Goldenberg, S., 2014. The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. *RNA Biol* 11, 921–933. <https://doi.org/10.4161/rna.29622>
- Amorim, J.C., Batista, M., da Cunha, E.S., Lucena, A.C.R., Lima, C.V. de P., Sousa, K., Krieger, M.A., Marchini, F.K., 2017. Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Sci Rep* 7, 9899. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10292-3>
- An, T., Liu, Y., Gourguechon, S., Wang, C.C., Li, Z., 2018. CDK Phosphorylation of Translation Initiation Factors Couples Protein Translation with Cell-Cycle Transition. *Cell Rep* 25, 3204–3214.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.063>
- Aphasizhev, R., Aphasizheva, I., 2011. Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. *Res Microbiol* 162, 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.015>
- Apt, W., 2010. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther* 4, 243–253. <https://doi.org/10.2147/dddt.s8338>
- Aramayo, R., Polymenis, M., 2017. Ribosome profiling the cell cycle: lessons and challenges. *Curr Genet* 63, 959–964. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0698-3>
- Araújo, P.R., Burle-Caldas, G.A., Silva-Pereira, R.A., Bartholomeu, D.C., Darocha, W.D., Teixeira, S.M.R., 2011. Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. *Parasitol Int* 60, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.01.006>
- Archer, S.K., Inchaustegui, D., Queiroz, R., Clayton, C., 2011. The cell cycle regulated transcriptome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* 6, e18425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018425>
- Archer, S.K., Luu, V.-D., de Queiroz, R.A., Brems, S., Clayton, C., 2009. *Trypanosoma brucei* PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle. *PLoS Pathog* 5, e1000565. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000565>
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carrington, M., Depledge, D.P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M.J., Gingle, A., Grant, G., Harb, O.S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J.C., Kraemer, E., Li, W., Logan, F.J., Miller, J.A., Mitra, S., Myler, P.J., Nayak, V., Pennington, C., Phan, I., Pinney, D.F., Ramasamy, G., Rogers, M.B., Roos, D.S., Ross, C., Sivam, D., Smith, D.F., Srinivasamoorthy, G., Stoeckert, C.J., Subramanian, S., Thibodeau, R., Tivey, A., Treatman, C., Velarde, G., Wang,

- REFERENCIAS -

- H., 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* 38, D457-462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>
- Aufderheide, A.C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L.E., Fornaciari, G., Allison, M., 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2034–2039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307312101>
- Avila, A.R., Dallagiovanna, B., Yamada-Ogatta, S.F., Monteiro-Góes, V., Fragoso, S.P., Krieger, M.A., Goldenberg, S., 2003. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Genet Mol Res* 2, 159–168.
- Avliyakov, N.K., Hines, J.C., Ray, D.S., 2003. Sequence elements in both the intergenic space and the 3' untranslated region of the *Crithidia fasciculata* KAP3 gene are required for cell cycle regulation of KAP3 mRNA. *Eukaryot Cell* 2, 671–677. <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.671-677.2003>
- Bailey, T.L., 2021. STREME: accurate and versatile sequence motif discovery. *Bioinformatics* 37, 2834–2840. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab203>
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., Noble, W.S., 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37, W202–208. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>
- Bangs, J.D., Crain, P.F., Hashizume, T., McCloskey, J.A., Boothroyd, J.C., 1992. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* 267, 9805–9815. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50165-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50165-X)
- Bao, Y., Mukai, K., Hishiki, T., Kubo, A., Ohmura, M., Sugiura, Y., Matsuura, T., Nagahata, Y., Hayakawa, N., Yamamoto, T., Fukuda, R., Saya, H., Suematsu, M., Minamishima, Y.A., 2013. Energy management by enhanced glycolysis in G1-phase in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* 11, 973–985. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0669-T>
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S., 2003. The trypanosomiases. *The Lancet* 362, 1469–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14694-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14694-6)
- Barrett, M.P., Kyle, D.E., Sibley, L.D., Radke, J.B., Tarleton, R.L., 2019. Protozoan persister-like cells and drug treatment failure. *Nat Rev Microbiol* 17, 607–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0238-x>
- Basu, S., Greenwood, J., Jones, A.W., Nurse, P., 2022. Core control principles of the eukaryotic cell cycle. *Nature* 607, 381–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04798-8>
- Belton, J.-M., McCord, R.P., Gibcus, J.H., Naumova, N., Zhan, Y., Dekker, J., 2012. Hi-C: a comprehensive technique to capture the conformation of genomes. *Methods* 58, 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.05.001>
- Benabdellah, K., González-Rey, E., González, A., 2007. Alternative trans-splicing of the *Trypanosoma cruzi* LYT1 gene transcript results in compartmental and functional switch for the encoded protein. *Mol Microbiol* 65, 1559–1567. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05892.x>
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P., Van Boom, J.H., Tromp, M.C., 1986. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819–826. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90063-2)
- Benz, C., Urbaniak, M.D., 2020. Proteome-Wide Quantitative Phosphoproteomic Analysis of *Trypanosoma brucei* Insect and Mammalian Life Cycle Stages. *Methods Mol Biol* 2116, 125–137. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0294-2_10
- Benz, C., Urbaniak, M.D., 2019. Organising the cell cycle in the absence of transcriptional control: Dynamic phosphorylation co-ordinates the *Trypanosoma brucei* cell cycle post-transcriptionally. *PLoS Pathog* 15, e1008129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008129>
- Berckmans, B., De Veylder, L., 2009. Transcriptional control of the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol* 12, 599–605. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.005>
- Bern, C., Montgomery, S.P., Herwaldt, B.L., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., Dantas, R.O., Maguire, J.H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L.V., Gilman, R.H., Reyes, P.A., Salvatella, R., Moore, A.C., 2007. Evaluation and treatment

- REFERENCIAS -

- of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* 298, 2171–2181. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>
- Berná, L., Chiribao, M.L., Greif, G., Rodriguez, M., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2017. Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. *PeerJ* 5, e3017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3017>
- Berná, L., Greif, G., Pita, S., Faral-Tello, P., Díaz-Viraqué, F., Souza, R.D.C.M.D., Vallejo, G.A., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2021. Maxicircle architecture and evolutionary insights into *Trypanosoma cruzi* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 15, e0009719. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009719>
- Berná, L., Rodriguez, M., Chiribao, M.L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., Alvarez-Valin, F., Robello, C., 2018. Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. *Microb Genom* 4, e000177. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000177>
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C.M., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.-J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M.A., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M.R., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E., El-Sayed, N.M., 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416–422. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>
- Biever, A., Glock, C., Tushev, G., Ciirdaeva, E., Dalmay, T., Langer, J.D., Schuman, E.M., 2020. Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes. *Science* 367, eaay4991. <https://doi.org/10.1126/science.aay4991>
- Blank, H.M., Perez, R., He, C., Maitra, N., Metz, R., Hill, J., Lin, Y., Johnson, C.D., Bankaitis, V.A., Kennedy, B.K., Aramayo, R., Polymenis, M., 2017. Translational control of lipogenic enzymes in the cell cycle of synchronous, growing yeast cells. *EMBO J* 36, 487–502. <https://doi.org/10.15252/embj.201695050>
- Bonney, K.M., 2014. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21, 11. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014012>
- Boothroyd, J.C., Cross, G.A., 1982. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene* 20, 281–289. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90046-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90046-4)
- Branche, C., Ochaya, S., Aslund, L., Andersson, B., 2006. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 147, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.01.005>
- Briggs, E.M., Marques, C.A., Oldrieve, G.R., Hu, J., Otto, T.D., Matthews, K.R., 2023. Profiling the bloodstream form and procyclic form *Trypanosoma brucei* cell cycle using single-cell transcriptomics. *Elife* 12, e86325. <https://doi.org/10.7554/eLife.86325>
- Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *Lancet* 392, 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Buscaglia, C.A., Campo, V.A., Di Noia, J.M., Torrecilhas, A.C.T., De Marchi, C.R., Ferguson, M.A.J., Frasch, A.C.C., Almeida, I.C., 2004. The surface coat of the mammal-dwelling infective trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* is formed by highly diverse immunogenic mucins. *J Biol Chem* 279, 15860–15869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314051200>

- REFERENCIAS -

- Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V., Priotto, G., 2017. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 390, 2397–2409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31510-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6)
- Calderano, S., Godoy, P., Soares, D., Sant'Anna, O.A., Schenkman, S., Elias, M.C., 2014. ORC1/CDC6 and MCM7 distinct associate with chromatin through *Trypanosoma cruzi* life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 193, 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.03.004>
- Calderano, S.G., de Melo Godoy, P.D., da Cunha, J.P.C., Elias, M.C., 2011a. Trypanosome prereplication machinery: a potential new target for an old problem. *Enzyme Res* 2011, 518258. <https://doi.org/10.4061/2011/518258>
- Calderano, S.G., de Melo Godoy, P.D., Motta, M.C.M., Mortara, R.A., Schenkman, S., Elias, M.C., 2011b. *Trypanosoma cruzi* DNA replication includes the sequential recruitment of pre-replication and replication machineries close to nuclear periphery. *Nucleus* 2, 136–145. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.2.15134>
- Callejas-Hernández, F., Gutierrez-Nogues, Á., Rastrojo, A., Gironès, N., Fresno, M., 2019. Analysis of mRNA processing at whole transcriptome level, transcriptomic profile and genome sequence refinement of *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep* 9, 17376. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53924-6>
- Callejas-Hernández, F., Rastrojo, A., Poveda, C., Gironès, N., Fresno, M., 2018. Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. *Sci Rep* 8, 14631. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32877-2>
- Camargo, E.P., Gazzinelli, R.T., Morel, C.M., Precioso, A.R., 2022. Why do we still have not a vaccine against Chagas disease? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 117, e200314. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200314>
- Campos, P.C., Bartholomeu, D.C., DaRocha, W.D., Cerqueira, G.C., Teixeira, S.M.R., 2008. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 38, 1383–1389. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.001>
- Cavalcanti, D.P., de Souza, W., 2018. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Scanning* 2018, 9603051. <https://doi.org/10.1155/2018/9603051>
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1, 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>
- Chang, C., Li, L., Zhang, C., Wu, S., Guo, K., Zi, J., Chen, Z., Jiang, J., Ma, J., Yu, Q., Fan, F., Qin, P., Han, M., Su, N., Chen, T., Wang, K., Zhai, L., Zhang, T., Ying, W., Xu, Z., Zhang, Y., Liu, Y., Liu, X., Zhong, F., Shen, H., Wang, Q., Hou, G., Zhao, H., Li, G., Liu, S., Gu, W., Wang, G., Wang, T., Zhang, G., Qian, X., Li, N., He, Q.-Y., Lin, L., Yang, P., Zhu, Y., He, F., Xu, P., 2014. Systematic analyses of the transcriptome, translome, and proteome provide a global view and potential strategy for the C-HPP. *J Proteome Res* 13, 38–49. <https://doi.org/10.1021/pr4009018>
- Chávez, S., 2012. Aproximación a la genómica funcional del ciclo celular de *Trypanosoma cruzi*.
- Chávez, S., Eastman, G., Smircich, P., Becco, L.L., Oliveira-Rizzo, C., Fort, R., Potenza, M., Garat, B., Sotelo-Silveira, J.R., Duhagon, M.A., 2017. Transcriptome-wide analysis of the *Trypanosoma cruzi* proliferative cycle identifies the periodically expressed mRNAs and their multiple levels of control. *PLoS One* 12, e0188441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188441>
- Chávez, S., Urbaniak, M.D., Benz, C., Smircich, P., Garat, B., Sotelo-Silveira, J.R., Duhagon, M.A., 2021. Extensive Translational Regulation through the Proliferative Transition of *Trypanosoma cruzi* Revealed by Multi-Omics. *mSphere* 6, e0036621. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00366-21>
- Chen, C.Y., Shyu, A.B., 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20, 465–470. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)89102-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)89102-1)
- Chin, A., Lécuyer, E., 2021. Puromycin Labeling Coupled with Proximity Ligation Assays to Define Sites of mRNA Translation in *Drosophila* Embryos and Human Cells. *Methods Mol Biol* 2381, 267–284. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1740-3_15
- Clayton, C., 2019. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol* 9, 190072. <https://doi.org/10.1098/rsob.190072>

- REFERENCIAS -

- Clayton, C., Michaeli, S., 2011. 3' processing in protists. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 247–255. <https://doi.org/10.1002/wrna.49>
- Clayton, C.E., 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21, 1881–1888. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.1881>
- Cordero, E.M., Cortez, C., Yoshida, N., da Silveira, J.F., 2019. Signal peptide recognition in *Trypanosoma cruzi* GP82 adhesin relies on its localization at protein N-terminus. *Sci Rep* 9, 7325. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43743-0>
- Coura, J.R., 2007. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1, 113–122. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000900018>
- Coura, J.R., Viñas, P.A., 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6–7. <https://doi.org/10.1038/nature09221>
- Cox, J., Mann, M., 2008. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367–1372. <https://doi.org/10.1038/nbt.1511>
- Crozier, T.W.M., Tinti, M., Wheeler, R.J., Ly, T., Ferguson, M.A.J., Lamond, A.I., 2018. Proteomic Analysis of the Cell Cycle of Procyclic Form *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Proteomics* 17, 1184–1195. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.000650>
- Cruz-Saavedra, L., Schwabl, P., Vallejo, G.A., Carranza, J.C., Muñoz, M., Patino, L.H., Paniz-Mondolfi, A., Llewellyn, M.S., Ramírez, J.D., 2022. Genome plasticity driven by aneuploidy and loss of heterozygosity in *Trypanosoma cruzi*. *Microb Genom* 8, mgen000843. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000843>
- da Cunha, J.P.C., Nakayasu, E.S., Elias, M.C., Pimenta, D.C., Téllez-Iñón, M.T., Rojas, F., Muñoz, M.J., Almeida, I.C., Schenkman, S., 2005. *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. *Mol Biochem Parasitol* 140, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.12.007>
- De Gaudenzi, J.G., Carmona, S.J., Agüero, F., Frasch, A.C., 2013. Genome-wide analysis of 3'-untranslated regions supports the existence of post-transcriptional regulons controlling gene expression in trypanosomes. *PeerJ* 1, e118. <https://doi.org/10.7717/peerj.118>
- De Gaudenzi, J.G., D'Orso, I., Frasch, A.C.C., 2003. RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *J Biol Chem* 278, 18884–18894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301756200>
- De Gaudenzi, J.G., Noé, G., Campo, V.A., Frasch, A.C., Cassola, A., 2011. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem* 51, 31–46. <https://doi.org/10.1042/bse0510031>
- de Godoy, L.M.F., Marchini, F.K., Pavoni, D.P., Rampazzo, R. de C.P., Probst, C.M., Goldenberg, S., Krieger, M.A., 2012. Quantitative proteomics of *Trypanosoma cruzi* during metacyclogenesis. *Proteomics* 12, 2694–2703. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200078>
- De Lange, T., Michels, P.A., Veerman, H.J., Cornelissen, A.W., Borst, P., 1984. Many trypanosome messenger RNAs share a common 5' terminal sequence. *Nucleic Acids Res* 12, 3777–3790. <https://doi.org/10.1093/nar/12.9.3777>
- De Souza, W., 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 8, 269–285. <https://doi.org/10.2174/1381612023396276>
- Desale, H., Herrera, C., Dumonteil, E., 2023. *Trypanosoma cruzi* amastigote transcriptome analysis reveals heterogenous populations with replicating and dormant parasites. *Microbes Infect* 105240. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023.105240>
- Di Paolo, A., Eastman, G., Mesquita-Ribeiro, R., Farias, J., Macklin, A., Kislinger, T., Colburn, N., Munroe, D., Sotelo Sosa, J.R., Dajas-Bailador, F., Sotelo-Silveira, J.R., 2020. PDCD4 regulates axonal growth by translational repression of neurite growth-related genes and is modulated during nerve injury responses. *RNA* 26, 1637–1653. <https://doi.org/10.1261/rna.075424.120>

- Di Renzo, M.A., Laverrière, M., Schenkman, S., Wehrendt, D.P., Tellez-Iñón, M.T., Potenza, M., 2016. Characterization of TcCYC6 from *Trypanosoma cruzi*, a gene with homology to mitotic cyclins. *Parasitol Int* 65, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.12.007>
- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M.L., Libisch, M.G., Robello, C., 2023. Genome-wide chromatin interaction map for *Trypanosoma cruzi*. *Nat Microbiol* 8, 2103–2114. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01483-y>
- Dinger, M.E., Amaral, P.P., Mercer, T.R., Mattick, J.S., 2009. Pervasive transcription of the eukaryotic genome: functional indices and conceptual implications. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8, 407–423. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elp038>
- Duhagon, M.A., Smircich, P., Forteza, D., Naya, H., Williams, N., Garat, B., 2011. Comparative genomic analysis of dinucleotide repeats in *Trityps*. *Gene* 487, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.07.022>
- Eastman, G., Smircich, P., Sotelo-Silveira, J.R., 2018. Following Ribosome Footprints to Understand Translation at a Genome Wide Level. *Comput Struct Biotechnol J* 16, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.04.001>
- Echavarría, N.G., Echeverría, L.E., Stewart, M., Gallego, C., Saldarriaga, C., 2021. Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol* 46, 100507. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>
- Elias, M.C., da Cunha, J.P.C., de Faria, F.P., Mortara, R.A., Freymüller, E., Schenkman, S., 2007. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist* 158, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2006.10.002>
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B., 2005a. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409–415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D.C., Haas, B.J., Tran, A.-N., Wortman, J.R., Alsmark, U.C.M., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J.M., Cerqueira, G.C., Creasy, T., Delcher, A.L., Djikeng, A., Embley, T.M., Hauser, C., Ivens, A.C., Kummerfeld, S.K., Pereira-Leal, J.B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S.L., Shallom, J., Silva, J.C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S.E., Donelson, J.E., Andersson, B., Stuart, K.D., Hall, N., 2005b. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309, 404–409. <https://doi.org/10.1126/science.1112181>
- Emanuele, M.J., Enrico, T.P., Emanuele, M.J., Enrico, T.P., 2019. Ubiquitin Signaling in Regulation of the Start of the Cell Cycle, in: *Ubiquitin Proteasome System - Current Insights into Mechanism Cellular Regulation and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82874>
- Erben, E.D., Fadda, A., Lueong, S., Hoheisel, J.D., Clayton, C., 2014. A genome-wide tethering screen reveals novel potential post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 10, e1004178. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004178>
- Fadda, A., Ryten, M., Droll, D., Rojas, F., Färber, V., Haanstra, J.R., Merce, C., Bakker, B.M., Matthews, K., Clayton, C., 2014. Transcriptome-wide analysis of trypanosome mRNA decay reveals complex degradation kinetics and suggests a role for co-transcriptional degradation in determining mRNA levels. *Mol Microbiol* 94, 307–326. <https://doi.org/10.1111/mmi.12764>
- Fan, H., Penman, S., 1970. Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis. *J Mol Biol* 50, 655–670. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90091-4)

- REFERENCIAS -

- Faria, J., Luzak, V., Müller, L.S.M., Brink, B.G., Hutchinson, S., Glover, L., Horn, D., Siegel, T.N., 2021. Spatial integration of transcription and splicing in a dedicated compartment sustains monogenic antigen expression in African trypanosomes. *Nat Microbiol* 6, 289–300. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00833-4>
- Fassolari, M., Alonso, G.D., 2019. Aurora kinase protein family in *Trypanosoma cruzi*: Novel role of an AUK-B homologue in kinetoplast replication. *PLoS Negl Trop Dis* 13, e0007256. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007256>
- Fort, R.S., Chavez, S., Trinidad Barnech, J.M., Oliveira-Rizzo, C., Smircich, P., Sotelo-Silveira, J.R., Duhagon, M.A., 2022. Current Status of Regulatory Non-Coding RNAs Research in the Trityp. *Noncoding RNA* 8, 54. <https://doi.org/10.3390/ncrna8040054>
- Franzén, O., Ochaya, S., Sherwood, E., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Miles, M.A., Andersson, B., 2011. Shotgun sequencing analysis of *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/1 and comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e984. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000984>
- Franzén, O., Talavera-López, C., Ochaya, S., Butler, C.E., Messenger, L.A., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Marinkelle, C.J., Tyler, K.M., Miles, M.A., Andersson, B., 2012. Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. *BMC Genomics* 13, 531. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-531>
- Galanti, N., Dvorak, J.A., Grenet, J., McDaniel, J.P., 1994. Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Exp Cell Res* 214, 225–230. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1252>
- García-Huertas, P., Cuesta-Astro, Y., Araque-Ruiz, V., Cardona-Castro, N., 2023. Transcriptional changes during metacyclogenesis of a Colombian *Trypanosoma cruzi* strain. *Parasitol Res* 122, 625–634. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07766-3>
- Garcia-Silva, M.R., Frugier, M., Tosar, J.P., Correa-Dominguez, A., Ronalte-Alves, L., Parodi-Talice, A., Rovira, C., Robello, C., Goldenberg, S., Cayota, A., 2010. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol Biochem Parasitol* 171, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.02.003>
- Gilinger, G., Bellofatto, V., 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Research* 29, 1556–1564. <https://doi.org/10.1093/nar/29.7.1556>
- Giordani, F., Morrison, L.J., Rowan, T.G., Koning, H.P.D., Barrett, M.P., 2016. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology* 143, 1862–1889. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001268>
- Godoy, P.D. de M., Nogueira-Junior, L.A., Paes, L.S., Cornejo, A., Martins, R.M., Silber, A.M., Schenkman, S., Elias, M.C., 2009. Trypanosome prereplication machinery contains a single functional *orc1/cdc6* protein, which is typical of archaea. *Eukaryot Cell* 8, 1592–1603. <https://doi.org/10.1128/EC.00161-09>
- Gómez, E.B., Kornblihtt, A.R., Téllez-Iñón, M.T., 1998. Cloning of a *cdc2*-related protein kinase from *Trypanosoma cruzi* that interacts with mammalian cyclins. *Mol Biochem Parasitol* 91, 337–351. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00218-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00218-1)
- Gómez, E.B., Santori, M.I., Laría, S., Engel, J.C., Swindle, J., Eisen, H., Szankasi, P., Téllez-Iñón, M.T., 2001. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Mol Biochem Parasitol* 113, 97–108. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(00\)00382-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(00)00382-0)
- Grant, C.E., Bailey, T.L., Noble, W.S., 2011. FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27, 1017–1018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064>
- Grant, K.M., 2008. Targeting the cell cycle in the pursuit of novel chemotherapies against parasitic protozoa. *Curr Pharm Des* 14, 917–924. <https://doi.org/10.2174/138161208784041042>
- Gray, M.W., 2012. Evolutionary origin of RNA editing. *Biochemistry* 51, 5235–5242. <https://doi.org/10.1021/bi300419r>

- Grisard, E.C., Teixeira, S.M.R., de Almeida, L.G.P., Stoco, P.H., Gerber, A.L., Talavera-López, C., Lima, O.C., Andersson, B., de Vasconcelos, A.T.R., 2014. *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announc* 2, e01114-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01114-13>
- Guerra-Slomp, E.P., Probst, C.M., Pavoni, D.P., Goldenberg, S., Krieger, M.A., Dallagiovanna, B., 2012. Molecular characterization of the *Trypanosoma cruzi* specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 420, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.154>
- Guha, K., Bhandari, D., Sen, T., Saha, P., 2014. Ubiquitination-mediated interaction among domains is responsible for inhibition of RNA endonuclease activity of mRNA cycling sequence binding protein from *L. donovani* (LdCSBP). *Parasitol Res* 113, 2941–2949. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3956-z>
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J.A., Bailey, T.L., Noble, W.S., 2007. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol* 8, R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r24>
- Hakim, J.M.C., Guarnizo, S.A.G., Machaca, E.M., Gilman, R.H., Mugnier, M.R., 2023. Whole Genome Assembly of a Hybrid *Trypanosoma cruzi* Strain Assembled with Nanopore Sequencing Alone. *bioRxiv* 2023.07.27.550875. <https://doi.org/10.1101/2023.07.27.550875>
- Hammarton, T.C., 2007. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 153, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.01.017>
- Hammarton, T.C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M., Mottram, J.C., 2003a. Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem* 278, 22877–22886. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300813200>
- Hammarton, T.C., Mottram, J.C., Doerig, C., 2003b. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res* 5, 91–101.
- Hu, H., Liu, Y., Zhou, Q., Siegel, S., Li, Z., 2015. The Centriole Cartwheel Protein SAS-6 in *Trypanosoma brucei* Is Required for Probasal Body Biogenesis and Flagellum Assembly. *Eukaryot Cell* 14, 898–907. <https://doi.org/10.1128/EC.00083-15>
- Hummel, H.S., Gillespie, R.D., Swindle, J., 2000. Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing. *J Biol Chem* 275, 35522–35531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002424200>
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., Weissman, J.S., 2009. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 324, 218–223. <https://doi.org/10.1126/science.1168978>
- Ingolia, N.T., Lareau, L.F., Weissman, J.S., 2011. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147, 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.002>
- Inoue, A.H., Serpeloni, M., Hiraiwa, P.M., Yamada-Ogatta, S.F., Muniz, J.R.C., Motta, M.C.M., Vidal, N.M., Goldenberg, S., Avila, A.R., 2014. Identification of a novel nucleocytoplasmic shuttling RNA helicase of trypanosomes. *PLoS One* 9, e109521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109521>
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Wortley, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M.R., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Müller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B., Myler, P.J., 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436–442. <https://doi.org/10.1126/science.1112680>

- Jensen, B.C., Ramasamy, G., Vasconcelos, E.J.R., Ingolia, N.T., Myler, P.J., Parsons, M., 2014. Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 15, 911. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-911>
- Kaplon, J., van Dam, L., Peeper, D., 2015. Two-way communication between the metabolic and cell cycle machineries: the molecular basis. *Cell Cycle* 14, 2022–2032. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1044172>
- Keeling, P.J., Burki, F., 2019. Progress towards the Tree of Eukaryotes. *Curr Biol* 29, R808–R817. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.031>
- Koç, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., Merrill, G.F., 2004. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* 279, 223–230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303952200>
- Koch, A., Gawron, D., Steyaert, S., Ndah, E., Crappé, J., De Keulenaer, S., De Meester, E., Ma, M., Shen, B., Gevaert, K., Van Crielinge, W., Van Damme, P., Menschaert, G., 2014. A proteogenomics approach integrating proteomics and ribosome profiling increases the efficiency of protein identification and enables the discovery of alternative translation start sites. *Proteomics* 14, 2688–2698. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400180>
- Koepp, D.M., 2014. Cell cycle regulation by protein degradation. *Methods Mol Biol* 1170, 61–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_4
- Kolev, N.G., Rajan, K.S., Tycowski, K.T., Toh, J.Y., Shi, H., Lei, Y., Michaeli, S., Tschudi, C., 2019. The vault RNA of *Trypanosoma brucei* plays a role in the production of trans-spliced mRNA. *J Biol Chem* 294, 15559–15574. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008580>
- Kong, S., Zhang, Y., 2019. Deciphering Hi-C: from 3D genome to function. *Cell Biol Toxicol* 35, 15–32. <https://doi.org/10.1007/s10565-018-09456-2>
- Kramer, S., 2021. Nuclear mRNA maturation and mRNA export control: from trypanosomes to opisthokonts. *Parasitology* 148, 1196–1218. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000068>
- Krieger, M.A., Avila, A.R., Ogatta, S.F., Plazanet-Menut, C., Goldenberg, S., 1999. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 165–168. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700021>
- Kurasawa, Y., An, T., Li, Z., 2020. Polo-like kinase in trypanosomes: an odd member out of the Polo family. *Open Biol* 10, 200189. <https://doi.org/10.1098/rsob.200189>
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L., Beverley, S.M., 1993. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7, 996–1007. <https://doi.org/10.1101/gad.7.6.996>
- Lee, B.Y., Bacon, K.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 13, 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
- Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A.T., Choi, J., Caradonna, K.L., Padmanabhan, P., Ndegwa, D.M., Temanni, M.R., Corrada Bravo, H., El-Sayed, N.M., Burleigh, B.A., 2016. Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathog* 12, e1005511. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005511>
- Libisch, M.G., Rego, N., Robello, C., 2021. Transcriptional Studies on *Trypanosoma cruzi* - Host Cell Interactions: A Complex Puzzle of Variables. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 692134. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.692134>
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L., 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health* 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S., Dekker, J., 2009. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>

- REFERENCIAS -

- Lima, A.R.J., de Araujo, C.B., Bispo, S., Patané, J., Silber, A.M., Elias, M.C., da Cunha, J.P.C., 2021. Nucleosome landscape reflects phenotypic differences in *Trypanosoma cruzi* life forms. *PLoS Pathog* 17, e1009272. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009272>
- Lima, A.R.J., Silva, H.G. de S., Poubel, S., Rosón, J.N., de Lima, L.P.O., Costa-Silva, H.M., Gonçalves, C.S., Galante, P.A.F., Holetz, F., Motta, M.C.M., Silber, A.M., Elias, M.C., da Cunha, J.P.C., 2022. Open chromatin analysis in *Trypanosoma cruzi* life forms highlights critical differences in genomic compartments and developmental regulation at tDNA loci. *Epigenetics Chromatin* 15, 22. <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00450-x>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lucena, A.C.R., Amorim, J.C., de Paula Lima, C.V., Batista, M., Krieger, M.A., de Godoy, L.M.F., Marchini, F.K., 2019. Quantitative phosphoproteome and proteome analyses emphasize the influence of phosphorylation events during the nutritional stress of *Trypanosoma cruzi*: the initial moments of in vitro metacyclogenesis. *Cell Stress Chaperones* 24, 927–936. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-01018-7>
- Mahmood, R., Hines, J.C., Ray, D.S., 1999. Identification of cis and trans elements involved in the cell cycle regulation of multiple genes in *Crithidia fasciculata*. *Mol Cell Biol* 19, 6174–6182. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.9.6174>
- Mahmood, R., Mitra, B., Hines, J.C., Ray, D.S., 2001. Characterization of the *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding proteins. *Mol Cell Biol* 21, 4453–4459. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4453-4459.2001>
- Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H.O., Bishop, J.R., Falcone, F.H., Gavrilescu, C., Montgomery, J.L., Santori, M.I., Stern, L.S., Wang, Z., Ullu, E., Tschudi, C., 2000. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6, 163–169. <https://doi.org/10.1017/s135583820099229x>
- Marin-Neto, J.A., Rassi, A., Morillo, C.A., Avezum, A., Connolly, S.J., Sosa-Estani, S., Rosas, F., Yusuf, S., BENEFIT Investigators, 2008. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 156, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.04.001>
- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., Myler, P.J., 2004. Transcription initiation and termination on *Leishmania* major chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3, 506–517. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.506-517.2004>
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela, R.G., Figueroa-Angulo, E.E., 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010, 525241. <https://doi.org/10.1155/2010/525241>
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., Myler, P.J., 2003. Transcription of *Leishmania* major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11, 1291–1299. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00143-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00143-6)
- McKean, P.G., 2003. Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* 6, 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.010>
- Michaeli, S., Doniger, T., Gupta, S.K., Wurtzel, O., Romano, M., Visnovetzky, D., Sorek, R., Unger, R., Ullu, E., 2012. RNA-seq analysis of small RNPs in *Trypanosoma brucei* reveals a rich repertoire of non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res* 40, 1282–1298. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr786>
- Minning, T.A., Weatherly, D.B., Atwood, J., Orlando, R., Tarleton, R.L., 2009. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 10, 370. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-370>
- Mitra, B., Ray, D.S., 2004. Presence of a poly(A) binding protein and two proteins with cell cycle-dependent phosphorylation in *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding protein II. *Eukaryot Cell* 3, 1185–1197. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1185-1197.2004>
- Mitra, B., Sinha, K.M., Hines, J.C., Ray, D.S., 2003. Presence of multiple mRNA cycling sequence element-binding proteins in *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem* 278, 26564–26571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304322200>
- Molyneux, D.H., 2014. Neglected tropical diseases: now more than just 'other diseases'--the post-2015 agenda. *Int Health* 6, 172–180. <https://doi.org/10.1093/inthealth/ihu037>

- REFERENCIAS -

- Murray, A.W., 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221–234. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01080-8)
- Nardelli, S.C., da Cunha, J.P.C., Motta, M.C.M., Schenkman, S., 2009. Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. *Chromosoma* 118, 487–499. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0213-9>
- Naula, C., Parsons, M., Mottram, J.C., 2005. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 1754, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.018>
- Ne, P.-M., Le, F.-M., Ee, F.-A., Rg, M.-C., R, H.-R., Pj, M., S, M.-C., 2009. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC genomics* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-232>
- Nunes, M.C.P., Dones, W., Morillo, C.A., Encina, J.J., Ribeiro, A.L., Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology, 2013. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol* 62, 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Nunes, V.S., Moretti, N.S., da Silva, M.S., Elias, M.C., Janzen, C.J., Schenkman, S., 2020. Trimethylation of histone H3K76 by Dot1B enhances cell cycle progression after mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1867, 118694. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118694>
- Ouellette, M., Papadopoulou, B., 2009. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. *J Biol* 8, 100. <https://doi.org/10.1186/jbiol203>
- Ozadam, H., Tonn, T., Han, C.M., Segura, A., Hoskins, I., Rao, S., Ghatpande, V., Tran, D., Catoe, D., Salit, M., Cenik, C., 2023. Single-cell quantification of ribosome occupancy in early mouse development. *Nature* 618, 1057–1064. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06228-9>
- Palenchar, J.B., Bellofatto, V., 2006. Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 146, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.12.008>
- Parthasarathy, A., Kalesh, K., 2020. Defeating the trypanosomatid trio: proteomics of the protozoan parasites causing neglected tropical diseases. *RSC Med Chem* 11, 625–645. <https://doi.org/10.1039/d0md00122h>
- Passos, A. de O., Assis, L.H.C., Ferri, Y.G., da Silva, V.L., da Silva, M.S., Cano, M.I.N., 2022. The Trypanosomatids Cell Cycle: A Brief Report. *Methods Mol Biol* 2579, 25–34. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2736-5_2
- Pastro, L., Smircich, P., Di Paolo, A., Becco, L., Duhagon, M.A., Sotelo-Silveira, J., Garat, B., 2017. Nuclear Compartmentalization Contributes to Stage-Specific Gene Expression Control in *Trypanosoma cruzi*. *Front Cell Dev Biol* 5, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00008>
- Peña-Díaz, J., Hegre, S.A., Anderssen, E., Aas, P.A., Mjelle, R., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Drabløs, F., Krokan, H.E., Sætrom, P., 2013. Transcription profiling during the cell cycle shows that a subset of Polycomb-targeted genes is upregulated during DNA replication. *Nucleic Acids Res* 41, 2846–2856. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1336>
- Pérez-Díaz, L., Pastro, L., Smircich, P., Dallagiovanna, B., Garat, B., 2013. Evidence for a negative feedback control mediated by the 3' untranslated region assuring the low expression level of the RNA binding protein TcRBP19 in *T. cruzi* epimastigotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436, 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.096>
- Pérez-Díaz, L., Silva, T.C., Teixeira, S.M.R., 2017. Involvement of an RNA binding protein containing Alba domain in the stage-specific regulation of beta-amastin expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 211, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.12.005>
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. *Lancet* 391, 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Perry, K.L., Watkins, K.P., Agabian, N., 1987. Trypanosome mRNAs have unusual “cap 4” structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8190–8194. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8190>

- Ploubidou, A., Robinson, D.R., Docherty, R.C., Ogbadoyi, E.O., Gull, K., 1999. Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4641–4650. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.24.4641>
- Poon, R.Y.C., 2016. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods Mol Biol* 1342, 3–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2957-3_1
- Porcile, P.E., Santos, M.R.M., Souza, R.T., Verbisck, N.V., Brandão, A., Urmenyi, T., Silva, R., Rondinelli, E., Lorenzi, H., Levin, M.J., Degrove, W., Franco da Silveira, J., 2003. A refined molecular karyotype for the reference strain of the *Trypanosoma cruzi* genome project (clone CL Brener) by assignment of chromosome markers. *Gene* 308, 53–65. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00489-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00489-x)
- Potenza, M., Schenkman, S., Laverrière, M., Tellez-Iñón, M.T., 2012. Functional characterization of TcCYC2 cyclin from *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 132, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.09.002>
- Quenault, T., Lithgow, T., Traven, A., 2011. PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol* 21, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.013>
- Radó, S., Fort, R.S., Garat, B., Sotelo-Silveira, J., Smircich, P., 2018. UTRme: A Scoring-Based Tool to Annotate Untranslated Regions in Trypanosomatid Genomes. *Front Genet* 9, 671. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00671>
- Rajan, K.S., Doniger, T., Cohen-Chalamish, S., Rengaraj, P., Galili, B., Aryal, S., Unger, R., Tschudi, C., Michaeli, S., 2020. Developmentally Regulated Novel Non-coding Anti-sense Regulators of mRNA Translation in *Trypanosoma brucei*. *iScience* 23, 101780. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101780>
- Ramanathan, M., Porter, D.F., Khavari, P.A., 2019. Methods to study RNA-protein interactions. *Nat Methods* 16, 225–234. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0330-1>
- Ramos, T.C.P., Nunes, V.S., Nardelli, S.C., dos Santos Pascoalino, B., Moretti, N.S., Rocha, A.A., da Silva Augusto, L., Schenkman, S., 2015. Expression of non-acetyltable lysines 10 and 14 of histone H4 impairs transcription and replication in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 204, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.11.001>
- Ray, D., Kazan, H., Cook, K.B., Weirauch, M.T., Najafabadi, H.S., Li, X., Gueroussov, S., Albu, M., Zheng, H., Yang, A., Na, H., Irimia, M., Matzat, L.H., Dale, R.K., Smith, S.A., Yarosh, C.A., Kelly, S.M., Nabat, B., Mecnas, D., Li, W., Laishram, R.S., Qiao, M., Lipshitz, H.D., Piano, F., Corbett, A.H., Carstens, R.P., Frey, B.J., Anderson, R.A., Lynch, K.W., Penalva, L.O.F., Lei, E.P., Fraser, A.G., Blencowe, B.J., Morris, Q.D., Hughes, T.R., 2013. A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* 499, 172–177. <https://doi.org/10.1038/nature12311>
- Recinos, R.F., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E., 2001. Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 113, 215–222. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00214-6](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00214-6)
- Reis-Cunha, J.L., Baptista, R.P., Rodrigues-Luiz, G.F., Coqueiro-Dos-Santos, A., Valdivia, H.O., de Almeida, L.V., Cardoso, M.S., D'Ávila, D.A., Dias, F.H.C., Fujiwara, R.T., Galvão, L.M.C., Chiari, E., Cerqueira, G.C., Bartholomeu, D.C., 2018. Whole genome sequencing of *Trypanosoma cruzi* field isolates reveals extensive genomic variability and complex aneuploidy patterns within TcII DTU. *BMC Genomics* 19, 816. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5198-4>
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., Aslund, L., 2008. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 283, 15884–15892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802081200>
- Romagnoli, B.A.A., Holetz, F.B., Alves, L.R., Goldenberg, S., 2020. RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00056>
- Rosón, J.N., Vitarelli, M. de O., Costa-Silva, H.M., Pereira, K.S., Pires, D. da S., Lopes, L. de S., Cordeiro, B., Kraus, A.J., Cruz, K.N.T., Calderano, S.G., Fragoso, S.P., Siegel, T.N., Elias, M.C., da Cunha, J.P.C., 2022. H2B.V demarcates divergent strand-switch regions, some tDNA loci, and genome compartments in *Trypanosoma cruzi* and affects parasite differentiation and host cell invasion. *PLoS Pathog* 18, e1009694. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009694>

- REFERENCIAS -

- Sabaj, V., Aslund, L., Pettersson, U., Galanti, N., 2001. Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem* 80, 617–624. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20010315\)80:4<617::aid-jcb1016>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010315)80:4<617::aid-jcb1016>3.0.co;2-d)
- Sánchez-Valdéz, F.J., Padilla, A., Wang, W., Orr, D., Tarleton, R.L., 2018. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife* 7, e34039. <https://doi.org/10.7554/eLife.34039>
- Santori, M.I., Laría, S., Gómez, E.B., Espinosa, I., Galanti, N., Téllez-Iñón, M.T., 2002. Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 121, 225–232. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(02\)00039-7](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(02)00039-7)
- Santos, A., Wernersson, R., Jensen, L.J., 2015. Cyclebase 3.0: a multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes. *Nucleic Acids Res* 43, D1140–1144. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1092>
- Santos, C.M.B.D., Ludwig, A., Kessler, R.L., Rampazzo, R. de C.P., Inoue, A.H., Krieger, M.A., Pavoni, D.P., Probst, C.M., 2018. *Trypanosoma cruzi* transcriptome during axenic epimastigote growth curve. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 113, e170404. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170404>
- Santos Júnior, A. de C.M.D., Melo, R.M., Ferreira, B.V.G., Pontes, A.H., Lima, C.M.R. de, Fontes, W., Sousa, M.V. de, Lima, B.D. de, Ricart, C.A.O., 2021. Quantitative proteomics and phosphoproteomics of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell cycle. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1869, 140619. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140619>
- Sather, S., Agabian, N., 1985. A 5' spliced leader is added in trans to both alpha- and beta-tubulin transcripts in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 5695–5699. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.17.5695>
- Shanmugasundram, A., Starns, D., Böhme, U., Amos, B., Wilkinson, P.A., Harb, O.S., Warrenfeltz, S., Kissinger, J.C., McDowell, M.A., Roos, D.S., Crouch, K., Jones, A.R., 2023. TriTrypDB: An integrated functional genomics resource for kinetoplastida. *PLoS Negl Trop Dis* 17, e0011058. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011058>
- Shikanai-Yasuda, M.A., Carvalho, N.B., 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* 54, 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Simpson, L., 1973. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool* 20, 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1973.tb05993.x>
- Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M.A., Guerra-Slompo, E.P., Garat, B., Goldenberg, S., Munroe, D.J., Dallagiovanna, B., Holetz, F., Sotelo-Silveira, J.R., 2015. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 16, 443. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1563-8>
- Smircich, P., El-Sayed, N.M., Garat, B., 2017. Intrinsic DNA curvature in trypanosomes. *BMC Res Notes* 10, 585. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2908-y>
- Smircich, P., Pérez-Díaz, L., Hernández, F., Duhagon, M.A., Garat, B., 2023. Transcriptomic analysis of the adaptation to prolonged starvation of the insect-dwelling *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Front Cell Infect Microbiol* 13, 1138456. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1138456>
- Solari, A.J., 1995. Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell* 19, 65–84.
- Stevens, J., Noyes, H., Gibson, W., 1998. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93, 669–676. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761998000500019>
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R., 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118, 1301–1310. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>
- Stumpf, C.R., Moreno, M.V., Olshen, A.B., Taylor, B.S., Ruggero, D., 2013. The translational landscape of the mammalian cell cycle. *Mol Cell* 52, 574–582. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.018>
- Tebaldi, T., Re, A., Viero, G., Pegoretti, I., Passerini, A., Blanzieri, E., Quattrone, A., 2012. Widespread uncoupling between transcriptome and translome variations after a stimulus in mammalian cells. *BMC Genomics* 13, 220. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-220>

- Tiengwe, C., Marcello, L., Farr, H., Gadelha, C., Burchmore, R., Barry, J.D., Bell, S.D., McCulloch, R., 2012. Identification of ORC1/CDC6-interacting factors in *Trypanosoma brucei* reveals critical features of origin recognition complex architecture. *PLoS One* 7, e32674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032674>
- Tinti, M., Güther, M.L.S., Crozier, T.W.M., Lamond, A.I., Ferguson, M.A.J., 2019. Proteome turnover in the bloodstream and procyclic forms of *Trypanosoma brucei* measured by quantitative proteomics. *Wellcome Open Res* 4, 152. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15421.1>
- Toledo, M.J.O., Bahia, M.T., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L.L., Alves, C.F., Martins, H.R., Cruz, R.E., Tafuri, W.L., Lana, M., 2004. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *J Antimicrob Chemother* 53, 1045–1053. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh224>
- Tyler, K.M., Engman, D.M., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 31, 472–481. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00153-9)
- Urbaniak, M.D., Martin, D.M.A., Ferguson, M.A.J., 2013. Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of *Trypanosoma brucei*. *J Proteome Res* 12, 2233–2244. <https://doi.org/10.1021/pr400086y>
- VanInsberghe, M., van den Berg, J., Andersson-Rolf, A., Clevers, H., van Oudenaarden, A., 2021. Single-cell Ribo-seq reveals cell cycle-dependent translational pausing. *Nature* 597, 561–565. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03887-4>
- Vasquez, J.-J., Hon, C.-C., Vanselow, J.T., Schlosser, A., Siegel, T.N., 2014. Comparative ribosome profiling reveals extensive translational complexity in different *Trypanosoma brucei* life cycle stages. *Nucleic Acids Res* 42, 3623–3637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1386>
- Vickers, K.C., Roteta, L.A., Hucheson-Dilks, H., Han, L., Guo, Y., 2015. Mining diverse small RNA species in the deep transcriptome. *Trends Biochem Sci* 40, 4–7. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.009>
- Wang, W., Peng, D., Baptista, R.P., Li, Y., Kissinger, J.C., Tarleton, R.L., 2021. Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS Pathog* 17, e1009254. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009254>
- Wang, Z., Englund, P.T., 2001. RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. *EMBO J* 20, 4674–4683. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4674>
- Warrenfeltz, S., Basenko, E.Y., Crouch, K., Harb, O.S., Kissinger, J.C., Roos, D.S., Shanmugasundram, A., Silva-Franco, F., 2018. EuPathDB: The Eukaryotic Pathogen Genomics Database Resource. *Methods Mol Biol* 1757, 69–113. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7737-6_5
- Weatherly, D.B., Boehlke, C., Tarleton, R.L., 2009. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics* 10, 255. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-255>
- Wheeler, R.J., Gull, K., Sunter, J.D., 2019. Coordination of the Cell Cycle in Trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 73, 133–154. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115617>
- WHO, 2023a. Global report on neglected tropical diseases 2023 [WWW Document]. URL <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/global-report-on-neglected-tropical-diseases-2023> (accessed 10.10.23).
- WHO, 2023b. Chagas disease, Key Fact Sheets [WWW Document]. URL [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed 10.10.23).
- Wilkinson, S.R., Taylor, M.C., Horn, D., Kelly, J.M., Cheeseman, I., 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5022–5027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M., 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1322>

- REFERENCIAS -

- Wittenberg, C., Reed, S.I., 2005. Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24, 2746–2755. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208606>
- Zeng, H., Huang, J., Ren, J., Wang, C.K., Tang, Z., Zhou, H., Zhou, Y., Shi, H., Aditham, A., Sui, X., Chen, H., Lo, J.A., Wang, X., 2023. Spatially resolved single-cell translomics at molecular resolution. *Science* 380, eadd3067. <https://doi.org/10.1126/science.add3067>
- Zick, A., Onn, I., Bezalel, R., Margalit, H., Shlomai, J., 2005. Assigning functions to genes: identification of S-phase expressed genes in *Leishmania major* based on post-transcriptional control elements. *Nucleic Acids Res* 33, 4235–4242. <https://doi.org/10.1093/nar/gki742>
- Zingales, B., 2018. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., Second Satellite Meeting, 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000700021>
- Zuma, A.A., Dos Santos Barrias, E., de Souza, W., 2021. Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 27, 1671–1732. <https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>