CONICET

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

I I B

Caracterización del rol de la proteína de unión a ARN TbRRM1 de *Trypanosoma brucei*

Lic. Analía Gabriela Níttolo

Tesis para optar por el título de

Doctora en Biología Molecular y Biotencología

de la Universidad Nacional de San Martín

Director: Dr. Daniel O. Sánchez

Co-directora: Dra. Gabriela V. Levy

2019

Agradecimientos

A toda mi familia, a **mamá**, **papá** y mis hermanas. En especial a **mamá** por haberme dado la vida, porque a pesar de todos los momentos difíciles que nos tocó vivir siempre estuviste conmigo para darme amor, apoyarme.y acompañarme.
A mis hermanas, **Romi** y **Yani**. Especialmente a mi melli **Yani**, gracias por el apoyo, la contención, los consejos y las ilustraciones que forman parte de esta Tesis. A mi futuro/a sobri.
A mi ***nonna***.

A mi Director **Daniel Sánchez**, por la dedicación, por todo lo aprendido, gracias por confiar en mi y por brindar el espacio adecuado para el seguimiento y discusión de los resultados. A mi Co-directora **Gabriela Levy**, gracias por haberme acompañado en este largo camino, por tu dedicación.
A **Valeria Tekiel**, gracias por tu ayuda, consejos y aportes a este trabajo.

A los técnicos del Instituto, especialmente a **Berta**, **Agus**, **Lili**, gracias por haberme instruido en el manejo de cultivo de parásitos. A **Tere**, por tu dedicación en la preparación del material de trabajo.

A mis amigas de la vida: **Naty**, **Eli**, **Ivi**, **Ise**, **Marce**, **Ville**, **Luciana**, **Bet**. Gracias por estar siempre, por tantos años de amistad incondicional.

A mis amigos de la FCEyN, sobre todo a **Anita** y **Lu**. Porque si llegué hasta acá fue gracias a ustedes, porque hicieron que el estudio sea más divertido.

A mis compañeros, **Chicho**, **Caro**, **Lucas**, **Yamil, Ludi, Pauli, Sol**. Gracias por la contención, el apoyo, los mates y las meriendas.
En especial a **Chicho**, gracias por tu ayuda en el dia a dia, por tu buena predispocisión. Gracias a **Gianni** por las innumerables maratones en el laboratorio, por los mates, las charlas y por tu amistad.

Agradezco especialmente al Dr. Juan Mucci por el anticuerpo anti-KMP-11, al Dr. Dante Maugeri por el suero anti-enolasa y al Dr. León Bouvier por haberme cedido gentilmente el vector pLEW100v5 con sus modificaciones.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por la financiación del proyecto de investigación llevado a cabo en esta Tesis.

A todos, **familiares y amigos**, por haberme acompañado en este largo camino que hoy concluye de la manera en que lo soñé.

La paura batte la porta, apri la fiducia e non c'era nessuno

Los resultados presentes en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

-***"TbRRM1 knockdown produces abnormal cell morphology and apoptotic-like death in the bloodstream form of T. brucei"*** Analía G. Níttolo, Carolina P. Bañuelos, Juan I Saborit, Valeria Tekiel, Daniel O. Sánchez y Gabriela V. Levy. Molecular and Biochemical Parasitology. Volumen 224:1-5. Septiembre 2018. doi: 10.1016/j.molbiopara.2018.07.006. Editorial: Elsevier Science BV.

-***"Depletion of the SR-related protein TbRRM1 leads to cell cycle arrest and programmed cell death in Trypanosoma brucei".*** Gabriela V. Levy, Carolina P. Bañuelos*****, Analía G. Níttolo*****, Nicolás Mendiondo*****, Gastón E. Ortiz*****, Georgina Moretti, Valeria S. Tekiel and Daniel O. Sánchez. *Contribución igualitaria. PLoS One. 10(8):e0136070. doi: 10.1371/journal.pone.0136070. Agosto 2015. Editorial: Public Library Science.

-Reunión conjunta de sociedades de Biociencias.
"TbRRM1 silencing induces cell death by an apoptotic-like mechanism in the bloodstream form stage of Trypanosoma brucei". Analía G. Níttolo, Carolina P. Bañuelos, Daniel O. Sánchez, Gabriela V. Levy. Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2017

-**XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias.** "El silenciamiento de TbRRM1 produce fenotipos anormales y muerte celular en el estadio sanguíneo de *Trypanosoma brucei*" Analía G. Níttolo, Carolina P. Bañuelos, Daniel O. Sánchez, Gabriela V. Levy. Ciudad de Santa Fe, Argentina. Noviembre de 2016.

-**Congreso de Protozoología y Enfermedades Parasitarias**.
"TbRRM1 silencing leads to DNA synthesis impairment and disturbs normal cell cycle progression in procyclic Trypanosoma brucei". Gabriela V. Levy, Carolina P. Bañuelos, Analía G. Níttolo, Valeria S. Tekiel and Daniel O. Sánchez**.** Mar del Plata, Argentina. Noviembre de 2014.

Índice

Resumen 1
Abstract 4
Abreviaturas 7
Introducción 9
Tripanosomátidos 10
Enfermedades causadas por Tripanosomátidos 11
Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas 14
Leishmaniasis 16
Tripanosomiasis Humana Africana 17
Ciclo de vida de *T. brucei* 19
Regulación de la expresión génica en Tripanosomátidos 21
Proteínas SR 23
TbRRM1 25
Objetivos 28
Materiales y Métodos 30
1) Cultivo de parásitos 31
    1.a) Estadio sanguíneo 31
    2.b) Estadio procíclico 31
2) Curvas de crecimiento 31
    2.a) Estadio sanguíneo 31
    2.b) Estadio procíclico 32
3) Inducción con tetraciclina 32
    3.a) Estadio sanguíneo 32
    3.b) Estadio procíclico 32
4) Cálculo de los tiempos de duplicación 32
5) Transfecciones 33
    5.a) Estadio sanguíneo 33
    5.b) Estadio procíclico 33
6) Clonado por dilución límite en el estadio procíclico 33
7) Purificación de ADN genómico de parásitos con DNAzol 34
8) Purificación de ARN de parásitos con TRIzol 34
9) Tratamiento con la enzima ADNasa RQ1 35
10) Reacción en cadena de la Polimerasa 35
11) Retrotranscripción 36

12) PCR en tiempo real 36
13) Preparación de bacterias competentes químicas por el método Inoue 36
14) Transformación de bacterias competentes químicas por choque térmico . 37
15) PCR *colony* 37
16) Purificación de ADN 37
16.a) Minipreparación 37
16.b) Maxipreparación 38
17) Purificación de ADN a partir de gel de agarosa 39
18) Cuantificación de ADN y ARN 40
18.a) Mediante mediciones de absorbancia 40
18.b) Mediante gel de agarosa 40
19) Construcciones 40
19.a) Construcción del ARNi de *TbRRM1* para el estadio sanguíneo 40
19.ai) Generación de extremos romos 42
19.aii) A-*Tailing* 42
19.aiii) T-*Tailing* 42
19.b) Construcción para la sobreexpresión de *TbRRM1* en el estadio procíclico 42
20) Ligación 43
20.a) Reacciones de ligación generales 43
20.b) Ligación en el vector pGEM-T Easy 44
21) Detección de colonias transformadas por medición de actividad β-galactosidasa 44
22) Secuenciaciones de ADN 44
23) Western blot 44
24) Inmunofluorescencia indirecta 45
24.a) Estadio sanguíneo 45
24.b) Estadio procíclico 46
25) Cuantificación de las configuraciones de N y K y análisis morfométricos de las distancias N/K y K/P 46
26) Ensayo de viabilidad por marcación con Rhodamina123 e ioduro de propodio 46
27) Cálculo del porcentaje de parásitos con potencial de membrana mirocondrial disminuido 47

28) Ensayo de marcación con Anexina V-FITC e ioduro de propidio en el estadio sanguíneo..... 47
29) Ciclo celular por citometría de flujo 47
29.a) Estadio sanguíneo 48
29.b) Estadio procíclico..... 48
Resultados 49
A) Localización subcelular de TbRRM1 por inmunofluorescencia indirecta en el estadio sanguíneo de *T. brucei* 50
B) Efecto del silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo 52
B.1) Silenciamiento por ARNi de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo. 52
B.2) Curva de crecimiento en parásitos del estadio sanguíneo depletados de TbRRM1 55
B.3) Ensayo de viabilidad por marcación con Rhodamina123 e Ioduro de propidio en los estadios procíclico y sanguíneo..... 56
B.4) Análisis de las morfologías observadas al depletar TbRRM1 en el estadio sanguíneo. 60
B.5) Análisis de la configuración de núcleos y kinetoplastos luego de la depleción de TbRRM1 en los estadios procíclico y sanguíneo..... 62
B.6) Análisis del ciclo celular por citometría de flujo luego de la depleción de TbRRM1 en los estadios procíclico y sanguíneo..... 66
B.7) Estudio del potencial de membrana mitocondrial luego del silenciamiento de *TbRRM1* en los estadios procíclico y sanguíneo 68
B.8) Marcación con Anexina V-FITC e ioduro de propidio en el estadio sanguíneo luego del silenciamiento de *TbRRM1*..... 70
C) Complementación de TbRRM1 en el estadio procíclico 72
C.1) Titulación de tetraciclina en parásitos de la línea 5'UTR depletados de TbRRM1 73
C.2) Ensayo de complementación de TbRRM1 por sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en el clon A12 74
D) Estudio del efecto de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en parásitos procíclicos del clon G11.A 76
D.1) Localización subcelular de la proteína 3xFLAG-TbRRM1 en clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*) 78

D.2) Morfologías de los parásitos del clon G11. A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1)* 80
D.3) Cuantificación de la configuración de núcleos y kinetoplastos en el clon G11.A (sobreexpresión de *3xfLAG-TbRRM1*) 81
D.4) Cuantificación de las distancias núcleo/kinetoplasto y kinetoplasto/extremo posterior en el clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*) 83
D.5) Cuantificación del porcentaje de parásitos con fenotipo nozzle en el clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*)..... 84
Discusión 86
Bibliografía..... 95
Anexo 107
Composición de Buffers y Soluciones..... 108
Tabla de primers utilizados 113
Tablas de anticuerpos utilizados..... 113

Resumen

Resumen

Dado que la transcripción en Tripanosomátidos es policistrónica, la regulación de la expresión génica en estos organismos se da principalmente a nivel post-transcripcional mediante proteínas de unión a ARN.
Nuestra proteína de estudio, TbRRM1, presenta tres dominios RRM de unión a ARN y forma parte del grupo de proteínas SR-relacionadas. Previamente, se ha demostrado en nuestro laboratorio que TbRRM1 es esencial para la sobrevida en el estadio procíclico de *Trypanosoma brucei* ya que su silenciamiento por ARNi afecta la curva de crecimiento y produce morfologías aberrantes. En este trabajo, se propuso caracterizar a la proteína de unión a ARN TbRRM1 y estudiarla como posible blanco terapéutico para el tratamiento de las Tripanosomiasis. Para ello, se generó un sistema estable para el silenciamiento inducible de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo de *T. brucei*. Los resultados demostraron que, al igual que en el estadio procíclico, TbRRM1 resulta esencial en el estadio del mamífero ya que su silenciamiento produce una disminución en la curva de crecimiento. Además, se demostró que la muerte de los parásitos se produce por un mecanismo compatible con apoptosis en ambos estadios de *T. brucei*. Los estudios de la cuantificación de núcleos y kinetoplastos en ambos estadios junto con el análisis del ciclo celular por marcación con ioduro de propidio y citometría de flujo demostraron que TbRRM1 es necesaria para la progresión normal del ciclo celular. Además, el silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo produjo la aparición de parásitos con flagelo desprendido y de células conectadas por su extremo posterior, lo que indica que TbRRM1 es necesaria para la correcta citoquinesis.
Por otra parte, se evaluaron los efectos de la sobreexpresión de *TbRRM1* en el estadio procíclico y se determinó que la elevada sobreexpresión de la proteína produce un fenotipo letal similar al observado luego del silenciamiento de *TbRRM1*.

Mediante los ensayos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, se caracterizó a la proteína de unión a ARN TbRRM1 demostrando que es esencial para la sobrevida en ambos estadios de *T. brucei*. Además, dado que TbRRM1 es esencial para el parásito y que no posee ortólogos en humanos, puede ser considerada un blanco potencial para el desarrollo de drogas que permitan mejorar la calidad de vida de pacientes que padecen enfermedades causadas por Tripanosomátidos

Abstract

Abstract

Since transcription in Trypanosomatids is polycistronic, regulation of gene expression in these organisms occurs mainly at post-transcriptional level by RNA binding proteins.

Our protein of interest, TbRRM1 has three RRM RNA binding domains and is a member of the group of SR-related proteins. Previously, it has been shown in our laboratory that TbRRM1 is essential for survival in the procyclic form stage of *Trypanosoma brucei* since its silencing by RNAi affects the growth curve and produces aberrant phenotypes.

This study aimed to characterize the TbRRM1 RNA binding protein and study it as a possible therapeutic target for the treatment of Trypanosomiasis. For this purpose, a stable system was generated for the inducible silencing of *TbRRM1* in the bloodstream form stage. The results showed that, as in the procyclic stage, TbRRM1 is essential for the mammalian stage since its silencing produces a decrease in the growth curve. In addition, it was demonstrated that the parasite death occurs by a mechanism compatible with apoptosis in both stages of *T. brucei*. The quantification of nuclei and kinetoplasts in both stages together with the analysis of the cell cycle by propidium iodide and flow cytometry showed that TbRRM1 is necessary for the normal progression of the cell cycle. In addition, silencing of *TbRRM1* in the bloodstream form stage of *T. brucei* produced the appearance of parasites with flagellum detachment and cells connected by their posterior end, indicating that TbRRM1 is necessary for cytokinesis.

On the other hand, the effects of overexpression of *TbRRM1* in the procyclic stage were evaluated and it was determined that the high overexpression of the protein produces a lethal phenotype similar to that observed after the silencing of *TbRRM1*.

Through the research carried out in this Thesis, TbRRM1 RNA binding protein was characterized, having demonstrated that it is essential for survival in both stages of *T. brucei*. Moreover, given that TbRRM1 is essential for the parasite and that it does not have orthologs in humans, it can be considered a potential target for the development of drugs that improve the quality of life of patients suffering from diseases caused by Trypanosomatids.

Abreviaturas

AcNa: acetato de sodio

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

AV: anexina V

BSA: albúmina sérica bovina

CO_2: dióxido de carbono

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

dATP: deoxiadenosina trifosfato

DMSO: dimetilsulfóxido

DO: densidad óptica

dNTP: deoxinucleósido trifosfato

dTTP: deoxitimidina trifosfato

DTT: dithiothreitol

Ψ: potencial de membrana mitocondrial

HCl: ácido clorhídrico

Hs: horas

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IP: ioduro de propidio

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

ml: mililitros

µl: microlitros

M: Molar

mM: milimolar

$MgCl_2$: cloruro de magnesio

NaOH: hidróxido de sodio

ng: nanogramos

NH_4Cl: cloruro de amonio

pb: pares de bases

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: reacción de cadena de la Polimerasa

PFA: paraformaldehído

PSG: Buffer fosfato salino suplementado con glucosa

qPCR: reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real

RBP: proteína de unión a ARN

Rho123: rhodamina 123

rpm: revoluciones por minuto

RRM: motivo de reconocimiento a ARN o “RNA recognition motif”

RS: dominio rico en serina-arginina

SDS: dodecil sulfato de sodio

SM: single marker

SOB: medio super optimal Broth

SOC: medio super optimal Broth suplementado con glucosa

TAE: Buffer Tris-Acetato-EDTA

TBE: Buffer Tris-Borato-EDTA

TDB: Buffer de dilución- de Trypanosoma

TBS: Buffer Tris salino

T. brucei: Trypanosoma brucei

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

Td: tiempo de duplicación

TE: Buffer Tris-EDTA

TET: tetraciclina

3’UTR: región 3’ no traducida

5’UTR: región 5’ no traducida

°C: grados centígrados

Introducción

Introducción

Tripanosomátidos

Los Tripanosomátidos son protozoos unicelulares pertenecientes a la clase Kinetoplástida. Además de su importancia sanitaria, estos organismos son interesantes desde el punto de vista de la biología celular, ya que tienen estructuras citoplasmáticas especializadas y orgánulos que han sido estudiados en detalle en los últimos años [1].

Además de presentar las organelas típicas de eucariotas, como la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, también se encuentran presentes algunas estructuras particulares. Entre ellos los glicosomas, organelas similares a peroxisomas especialmente modificados para realizar la glucólisis [2]; y los acidocalcisomas, gránulos electrónicamente densos involucrados en el metabolismo del polifosfato y pirofosfato, y en el almacenamiento de calcio **(Figura 1)** [3].

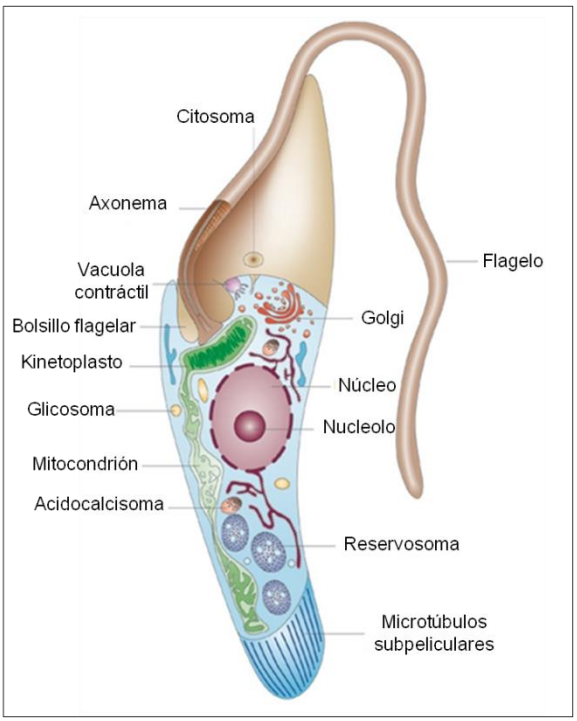

Figura 1. Esquema de una sección longitudinal de un Tripanosomátido representando las principales estructuras y organelas, tomando como modelo la forma epimastigote de *T. cruzi*. Modificado de *W. de Souza* [1].

Otra característica distintiva de los tripanosomátidos con respecto al resto de los eucariotas es que poseen una gran mitocondria única denominada mitocondrión cerca de la cual se origina el flagelo [4]. Dentro del mitocondrión

se encuentra una región especializada que alberga ADN mitocondrial, llamada kinetoplasto (kDNA). El kDNA está compuesto por dos tipos de ADN circular: minicírculos (0,5 a 10 kb) y maxicírculos (20 a 40 kb) que, a diferencia de cualquier otro tipo de ADN en la naturaleza, se organizan formando una red de anillos entrelazados. El conocimiento de la arquitectura del kinetoplasto es crucial para comprender la replicación y la segregación del kDNA ya que las moléculas involucradas en estos procesos están posicionadas con precisión en dominios funcionales dentro de esta estructura [5; 6].

Por otra parte, la membrana celular de estos protozoos está formada por una red de microtúbulos entrelazado que se localizan por debajo de la membrana plasmática. Estos microtúbulos subpeliculares, que contribuyen a mantener la forma del parásito [7], están distribuidos por toda la membrana, excepto en el bolsillo flagelar. El bolsillo flagelar consiste en una pequeña invaginación de la membrana plasmática desde donde emerge el flagelo. Las membranas que forman parte del bolsillo flagelar no se encuentra asociadas a microtúbulos subpeliculares, y conforman el único sitio del parásito en donde pueden ocurrir procesos de endocitosis y exocitosis [8].

El estudio de las organelas y estructuras peculiares presentes en Tripanosomátidos ha permitido abordar el estudio de nuevas vías metabólicas y procesos, lo que abre nuevas posibilidades para la identificación de blancos terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos parásitos [1].

Enfermedades causadas por Tripanosomátidos

Si bien algunos miembros del grupo Kinetoplástida son microorganismos de vida libre, otros son de gran importancia médica, veterinaria y económica ya que infectan una amplia gama de huéspedes, incluidos humanos, animales y plantas [9]. Las enfermedades humanas más comunes causadas por Kinetoplástidos incluyen la Tripanosomiasis Africana Humana o HAT por sus siglas en inglés (también conocida como Enfermedad del sueño), causada por la infección con dos de las tres subespecies de *Trypanosoma brucei*; la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, causada por la infección con *Trypanosoma cruzi*; y la Leishmaniasis cutánea o visceral atribuibles a aproximadamente 20 especies de Leishmania. Las enfermedades causadas

por Tripanosomátidos se distribuyen ampliamente en todo el mundo, aunque la transmisión activa se produce principalmente en los países más pobres donde los sistemas de salud son precarios o incluso inexistentes [10] **(Figura 2)**.

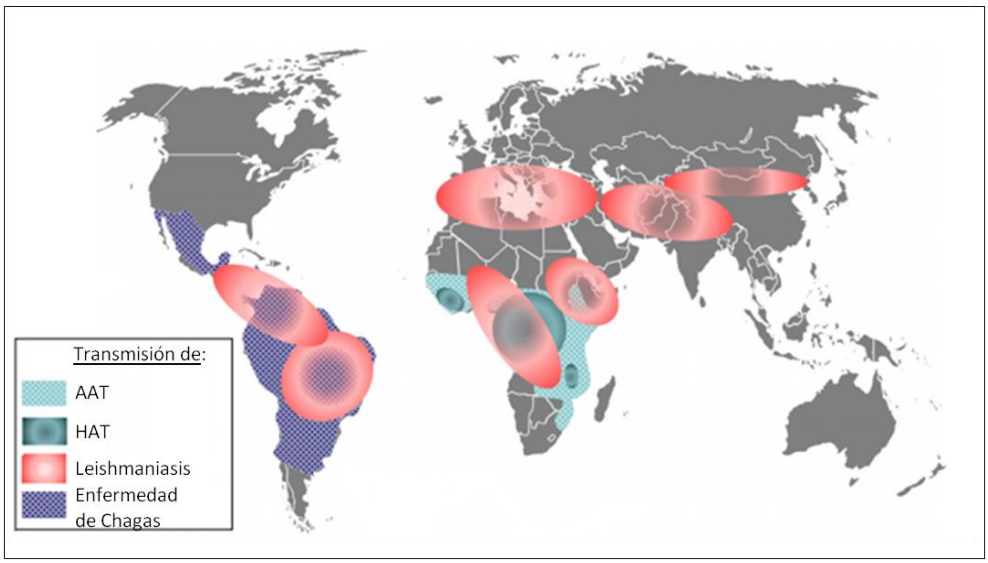

Figura 2. Áreas de transmisión de las enfermedades causadas por Tripanosomátidos. Se representan en distintos colores las áreas de transmisión de cada enfermedad. (AAT: Tripanosomiasis Animal Africana. HAT: Tripanosomiasis Africana Humana). Modificado de *D. Berthier y Col., 2016* [10].

Aproximadamente medio billón de personas en áreas tropicales y subtropicales del mundo están en riesgo de contraer estas enfermedades y se estima que más de 20 millones de personas están infectadas, lo que resulta en más de 100.000 muertes por año [4]. Con la excepción de la Tripanosomiasis Humana Africana causada por *Trypanosoma brucei gambiense* y las infecciones causadas por *Leishmania tropica* y *Leishmania donovani*, para los cuales los humanos son considerados el principal reservorio, las enfermedades asociadas a Tripanosomátidos son predominantemente zoonóticas, y los reservorios animales juegan un papel clave en el mantenimiento de la endemicidad y propagación de la enfermedad [11].

Las enfermedades causadas por Tripanosomátidos están asociadas con una gran variedad de síntomas que difieren en la gravedad y los mecanismos de la patogénesis, así como también en el sitio de preferencia de desarrollo dentro del hospedador vertebrado [12] **(Figura 3)**.

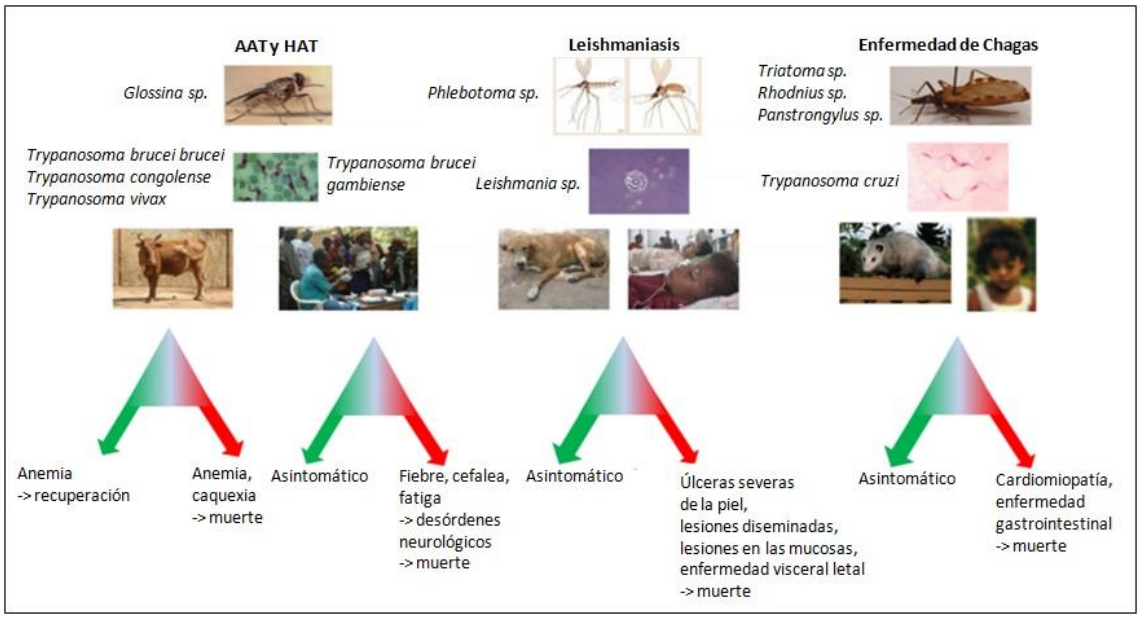

Figura 3. Enfermedades causadas por Tripanosomátidos. Para cada enfermedad se describen el insecto vector, el parásito que la produce y los distintos síntomas cuya gravedad se relaciona con la evolución de la enfermedad. Modificado de *D. Berthier y Col.*, 2016. [10].

Una característica común que tienen los Tripanosomátidos radica en la capacidad para inducir infecciones crónicas asintomáticas, siendo la variación antigénica y la respuesta inmune del hospedador determinantes para el curso de la enfermedad. Los mecanismos que subyacen al control de estas infecciones por parte del hospedador están comenzando a entenderse y pueden proporcionar nuevos objetivos terapéuticos para estas enfermedades tropicales desatendidas [10; 13].

Además, comprender las diferencias a nivel genético, molecular y celular entre estos patógenos podría proporcionar nuevos enfoques para el desarrollo de diagnósticos, vacunas, medicamentos y otras herramientas necesarias para combatir las enfermedades causadas por Tripanosomátidos.

Lograr estos objetivos en la actualidad es más factible debido a una combinación de nuevos conocimientos sobre los genomas y la bioquímica de parásitos. Estos avances recientes, junto con estudios epidemiológicos podrían complementar la vigilancia, el control de vectores y de los reservorios con el objetivo de lograr la erradicación de estas enfermedades [4].

Tripanosomiasis americana o Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis potencialmente mortal cuyo agente etiológico es el parásito *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad se desarrolla en zonas endémicas de 21 países de América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en Estados Unidos, Canadá y en algunos países de Europa y del Pacífico Occidental en respuesta a la creciente migración y rutas de transmisión no vectoriales como transfusión de sangre, trasplante de órganos o vía congénita [14; 15].

Se estima que 8 millones de personas en América Latina están infectadas con este parásito y 100 millones de habitantes que viven en áreas endémicas (es decir, el 25% de la población total en América Latina) están en riesgo de contraer la enfermedad [16].

En 2015, se estimó que más del 80% de las personas en el mundo afectadas por la Enfermedad de Chagas no tienen acceso a un diagnóstico y tratamiento adecuado, lo que contribuye al aumento en la morbilidad y la mortalidad de los pacientes. Aunque el tratamiento no está indicado para todos los casos, la mayoría de los infectados en fase crónica deben recibir un tratamiento específico [17].

T. cruzi tiene tres estadios de desarrollo: las formas replicativas de epimastigote y amastigote, y el estadio infeccioso no replicativo de tripomastigote **(Figura 4)**. La infección por *T. cruzi* se inicia cuando los tripomastigotes metacíclicos son excretados junto con las heces del triatomino y penetran en la herida generada por la picadura del insecto. Si bien esta es la principal vía de transmisión de la enfermedad, las transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, transmisión congénita o, incluso la contaminación de los alimentos son otros modos de adquirir la enfermedad [14].

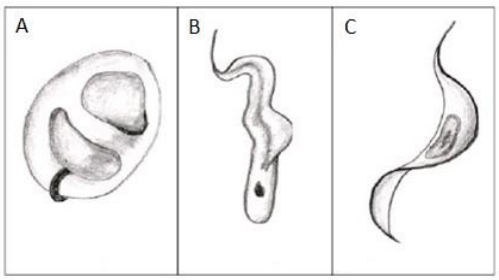

Figura 4. Estadios de desarrollo de *Trypanosoma cruzi*. (A) Amastigote. **(B)** Epimastigote. **(C)** Tripomastigote
Adaptado de *A. Toso M. y Col., 2011*. [18]

Luego de la infección, los tripomastigotes metacíclicos son internalizados por la célula del hospedador en un compartimento unido a la membrana celular, denominado vacuola parasitófora, de la cual posteriormente escapan y se diferencian a amastigotes. Luego de varios ciclos de división binaria en el citosol de la célula del hospedador, se diferencian a tripomastigotes sanguíneos. Después de la lisis de la célula hospedadora, los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar células vecinas [19].

La Enfermedad de Chagas presenta dos etapas: una etapa aguda y una crónica. Durante la etapa aguda (4-8 semanas post-infección) una gran cantidad de parásitos circulan por el torrente sanguíneo del mamífero. En la mayoría de los casos no hay síntomas o éstos son leves e inespecíficos, sin embargo es común observar inflamación en la vía de entrada del parásito. Si la infección no es tratada durante la etapa aguda, se desarrolla la etapa indeterminada en la que no hay síntomas clínicos. Finalmente, durante la etapa crónica, aproximadamente un tercio de los pacientes puede desarrollar problemas cardíacos o digestivos. Las cardiomiopatías presentan gran morbilidad y mortalidad, y se generan por la persistencia del parásito durante un tiempo prolongado en el tejido cardíaco, lo que genera daño por su acción y por la gran inflamación [20; 21].

La mayoría de las investigaciones publicadas sobre la patogénesis de las cardiopatías asociadas a la infección por *T. cruzi* se deben a la persistencia de los parásitos y a la autoinmunidad. Los bajos niveles de parasitemia en la etapa crónica de la Enfermedad de Chagas se contraponen con la patología cardíaca severa observada en aproximadamente el 30% de los pacientes crónicos, lo que sugiere un papel clave de la autoinmunidad del hospedador en el origen de las cardiopatías. Se han despcrito mecanismos, como la “mímica molecular” mediante el cual la infección por *T. cruzi* podría conducir a la autoinmunidad. Diversos antígenos de *T. cruzi*, como B13, cruzipain y Cha, reaccionan de forma cruzada con los antígenos del hospedador a nivel de células B o T y su papel en la patogénesis ha sido ampliamente estudiado. Desafortunadamente en la actualidad no hay vacunas disponibles y las drogas antiparasitarias presentan alta toxicidad y sólo son efectivas durante la etapa aguda de la enfermedad [22].

Leishmaniasis

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo del género *Leishmania* que se transmite al mamífero por la picadura de un flebótomo hembra infectado. La Leishmaniasis es endémica en 98 países y aproximadamente 350 millones de personas son susceptibles a contraer esta enfermedad [23].

En el mamífero, el parásito presenta dos formas: los promastigotes metacíclicos (formas infecciosas) que se introducen en la piel por la picadura del insecto y los amastigotes intracelulares, morfología que permanece durante el ciclo de vida en el mamífero [24; 25].

La enfermedad se presenta en tres formas principales: Leishmaniasis visceral o Kala-azar, Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis mucocutánea [26]. La diferencia en la manifestación clínica depende del sistema inmune del hospedador y de la cepa del parásito que provoca la enfermedad [27].

La Leishmaniasis visceral, que afecta a más de 79 países es causada por la infección con las especies *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, y *Leishmania donovani* [28]. La Leishmaniasis visceral, la forma más letal de la enfermedad y se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. El diagnóstico es dificultoso y el 95% de los pacientes no sobrevive sin el tratamiento adecuado [29]. Esta enfermedad, que en la mayoría de los pacientes permanece asintomática, tiene una incidencia de 20.000 a 40.000 nuevos casos por año, siendo predominante en Bangladesh, India, Nepal, Sudán, Sudán del Sur, Etiopía y Brasil [30].

La Leishmaniasis cutánea, la forma más frecuente de Leishmaniasis, es causada por la infección con las especies *Leishmania major*, *Leishmania tropica, Leishmania braziliensis y Leishmania mexicana.* Se distribuye ampliamente, en América, en la cuenca del Mediterráneo y Asia occidental [30]; [28]. Durante esta enfermedad los parásitos permanecen en el tejido epitelial provocando úlceras cutáneas crónicas. Si bien algunas de estas lesiones pueden curarse sin ningún tratamiento, la erradicación de la enfermedad puede llevar varios meses y dejar cicatrices de por vida [26].

La Leishmaniasis mucocutánea produce una inflamación crónica que afecta a la mucosa nasal, faríngea y laríngea. En esta enfermedad, que se desarrolla como una complicación de la Leishmaniasis cutánea, los parásitos se

diseminan desde el sitio de la lesión cutánea primaria a través de los vasos linfáticos y la sangre para llegar a la mucosa del tracto respiratorio superior, provocando la destrucción de los tejidos [31].

En los últimos años se han presentado tres vacunas candidatas para ensayos clínicos en pacientes con Leishmaniasis: (i) vacuna para inmunoterapia basada en extractos crudos de antígenos parasitarios en Brasil [32], (ii) vacuna viva atenuada registrada en Uzbekistán, autorizada como tratamiento en poblaciones de alto riesgo para el desafío en humanos en Irán [33], (iii) vacuna de segunda generación para la profilaxis de perros en Brasil [34]. Además, hay al menos una docena de vacunas candidatas y se espera que, en un futuro próximo, la comprensión de todo el genoma de *Leishmania spp*. amplíe el descubrimiento de nuevas terapias [35].

Tripanosomiasis Africana Humana

Trypanosoma brucei es el agente causal de la Tripanosomiasis Humana Africana, o Enfermedad del sueño, que amenaza a más de 60 millones de personas en 36 países de África subsahariana, y de la Tripanosomiasis Animal Africana o Nagana en el ganado. Las poblaciones más expuestas a contraer la enfermedad son aquellas que viven en zonas rurales remotas con acceso limitado a servicios de salud adecuados, lo que dificulta la vigilancia y, por lo tanto, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad [36].

El parásito se transmite al mamífero por la picadura de la mosca *tsé-tsé* (del género *Glossina*) y se caracteriza por episodios de fiebre, inflamación de ganglios linfáticos y dolores musculares y articulares. En etapas avanzadas, la Enfermedad del Sueño ataca el sistema nervioso central causando confusión, irritabilidad, alteraciones sensoriales, dificultad para caminar y hablar y alteraciones en el ciclo del sueño, lo que le da nombre a la enfermedad.

La transmisión puede ocurrir en niños y adultos durante actividades cotidianas como la agricultura, la caza o la pesca.

Las subespecies de *T. brucei* patógenas para humanos son: *T. brucei gambiense*, que causa una enfermedad crónica en África central y occidental; y *T. brucei rhodesiense*, que causa una enfermedad más aguda en África oriental y meridional **(Figura 5)**.

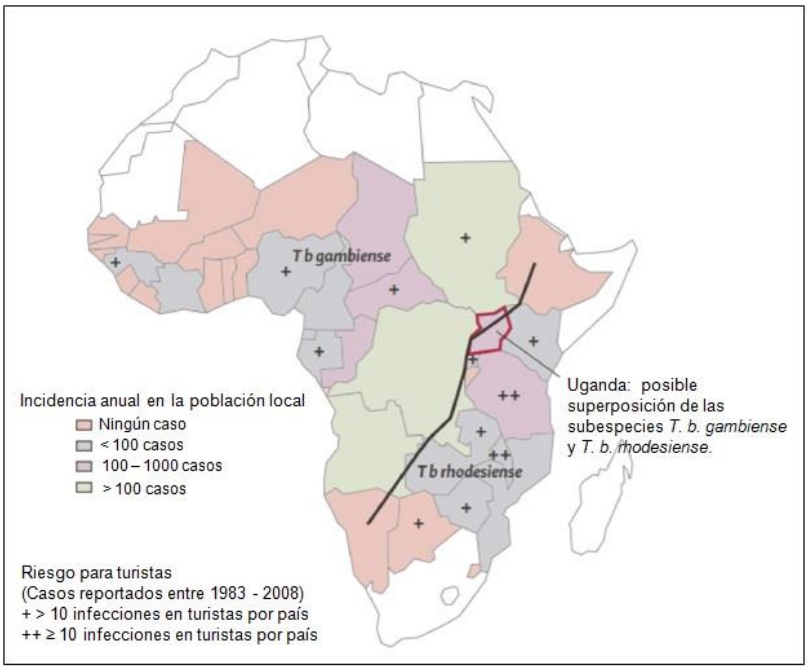

Figura 5. Distribución de la Tripanosomiasis Africana. La línea negra divide las áreas en las que predominan las subespecies *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense.* Adaptado de *R. Brun y Col., 2009* [37].

Por otra parte,*T. brucei brucei*, infecta animales domésticos y salvajes pero no al hombre [37].

T. brucei gambiense se encuentra en 24 países de África occidental y central. Esta forma representa en la actualidad más del 97% de los casos notificados de la Enfermedad del sueño, provocando una infección crónica.

En cuanto a la sintomatología de la enfermedad, una persona puede estar infectada por meses o incluso años sin presentar manifestaciones clínicas importantes. Cuando surgen síntomas evidentes, el paciente a menudo ya se encuentra en una etapa avanzada de la enfermedad, dado que ya se ve afectado el sistema nervioso central. *T. brucei rhodesiense* se encuentra en 13 países de África oriental y del sur y, en la actualidad, esta forma representa menos del 3% de los casos notificados y causa una infección aguda. Los primeros síntomas se observan a las pocas semanas o a los pocos meses después de la infección, evolucionando rápidamente y afectando al sistema nervioso central.

Según la Organización Mundial de la Salud, la República Democrática del Congo es el único país que ha reportado más de 1000 casos nuevos anualmente y representa el 83% de los casos ocurridos en 2012. República Centroafricana, Chad y Sudán del Sur declararon entre 100 y 500 casos nuevos durante el 2012 [38].

En la actualidad existen cuatro medicamentos disponibles para el tratamiento de la Enfermedad del sueño: suramina, pentamidina, melarsoprol y eflornitina; siendo este último desarrollado originalmente para el tratamiento contra el cáncer [39]. Estos medicamentos se administran dependiendo de la especie del parásito causante de la enfermedad y de la etapa en la que se diagnostique al paciente.

Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*

T. brucei presenta un ciclo de vida complejo que alterna entre dos hospedadores: un insecto vector, la mosca *tsé-tsé*, y el mamífero. Cuando una mosca *tsé-tsé* infectada pica a un hospedador mamífero se liberan tripomastigotes metacíclicos desde las glándulas salivales del insecto al torrente sanguíneo del hospedador [40]. El parásito sobrevive libre en el torrente sanguíneo, pudiendo evadir la respuesta inmune a través de un mecanismo denominado variación antigénica. La variación antigénica conlleva a la expresión secuencial de glicoproteínas variables de superficie (VSG) que se encuentran unidas a la membrana celular por un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI) [41; 42]. Los tripomastigotes metacíclicos se diferencian a la forma replicativa sanguínea, que establece y mantiene una infección en el torrente sanguíneo, pudiendo llegar al sistema nervioso central. En el torrente sanguíneo se produce la diferenciación a la forma corta no replicativa (*short stumpy*) en respuesta a la densidad celular [40]. Esta diferenciación tiene dos propósitos: en primer lugar, la acumulación de formas no replicativas limita el aumento del número de parásitos y, por lo tanto, prolonga la supervivencia del hospedador y la probabilidad de transmisión de la enfermedad; y en segundo lugar, la forma *short stumpy* está pre adaptada para vivir en la mosca, lo que resulta crucial para completar el ciclo de vida del parásito [43].

Cuando el mamífero infectado es picado por la mosca *tsé-tsé*, la forma *short stumpy* se diferencia a tripomastigotes procíclicos, los cuales se establecen en el intestino medio de la mosca y reanudan la división celular. Los tripomastigotes procíclicos luego se unen al epitelio de la glándula salival de la mosca, donde se produce una división asimétrica generando epimastigotes largos y epimastigotes cortos. Los epimastigotes cortos quedan unidos a las

células epiteliales de la glándula salival donde se replican y diferencian a tripomastigotes metacíclicos, quedando libres en el lumen de la glándula salival de la mosca adaptados a sobrevivir en el mamífero [40] **(Figura 6)**.

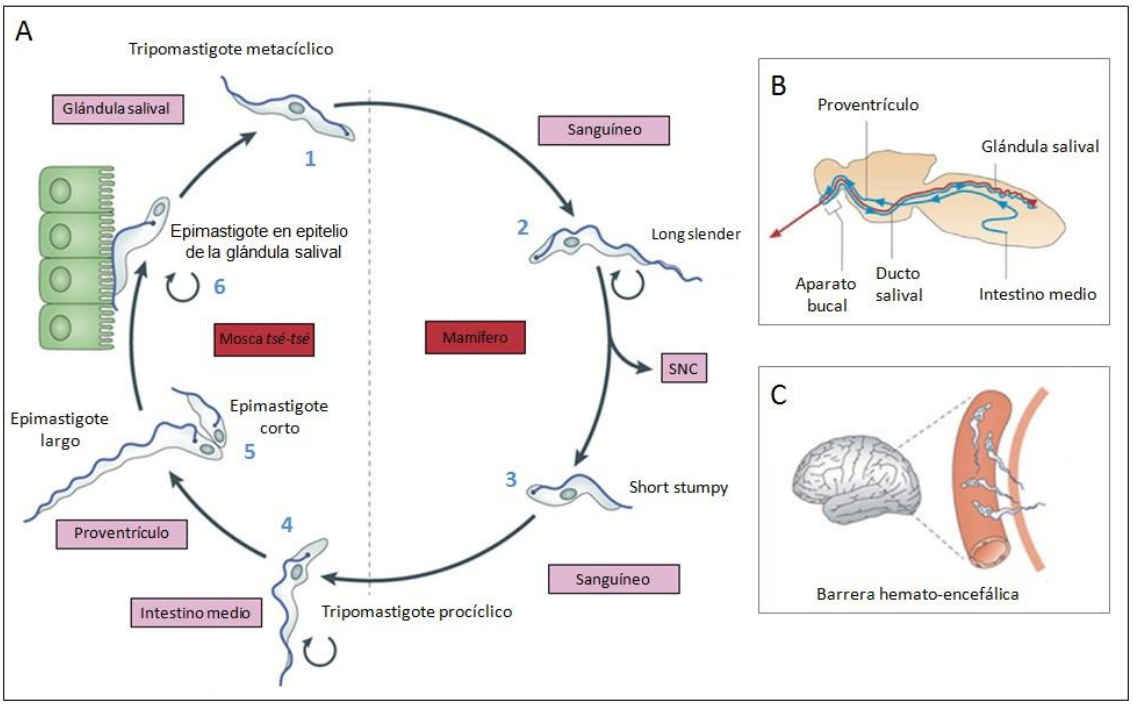

Figura 6. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. (A) Ciclo de vida de *T. brucei* durante la infección del hospedador mamífero. **(B)** Desplazamiento del parásito dentro de la mosca *tse-tsé*. La línea azul representa la ruta desde el intestino medio a la glándula salival y la línea roja indica la ruta desde la glándula salival hasta el aparato bucal de la mosca. **(C)** Dentro del mamífero los parásitos migran fuera de los vasos sanguíneos, atravesando la barrera hematoencefálica y pudiendo ingresar al SNC. Adaptado de *G. Langousis y K.L. Hill, 2014*. [40]

A lo largo del ciclo de vida, el parásito debe adaptarse a entornos muy diferentes. En el hospedador mamífero, tales adaptaciones incluyen evadir el sistema inmune mediante la variación antigénica, así como también adaptaciones metabólicas para utilizar los nutrientes disponibles. Por ejemplo, los niveles de glucosa en el cerebro normalmente son del 10-20% con respecto a los niveles en sangre [44], mientras que el tejido adiposo es una mejor fuente de lípidos. Recientemente se ha reportado que el tejido adiposo conforma un reservorio de *T. brucei* en ratones, pudiendo explicar la pérdida de peso del hospedador durante la infección [45]. En el torrente sanguíneo de los

mamíferos, la forma *long slender* se divide activamente y metaboliza la glucosa en piruvato a través de una vía glucolítica que está parcialmente compartimentalizada dentro de los glicosomas [46]. En el insecto, el parásito tiene que adaptarse a un entorno libre de glucosa pero rico en aminoácidos, particularmente prolina [47]. En consecuencia, *T. brucei* debe reprogramar su metabolismo para adaptarse y beneficiarse de los nutrientes disponibles en el entorno del hospedador [48].

Regulación de la expresión génica en Tripanosomátidos

Además de la importancia de los Tripanosomátidos por su relevancia médica, la biología de estos organismos resulta de gran interés ya que ocurren procesos peculiares en relación con otros eucariotas [49]. Por ejemplo, durante la división celular los cromosomas no se condensan ni tampoco ocurre la disrupción de la membrana nuclear. Además, se encuentran organelas como los glicosomas que concentran enzimas e intermediarios de la vía glucolítica. Además, se producen modificaciones post-transcripcionales a nivel del ARN mitocondrial (proceso conocido como edición del ARN, requerido para la correcta expresión de enzimas mitocondriales) [50].

Por otro lado, en eucariotas los genes que codifican para proteínas son transcriptos por la ARN Polimerasa II, mientras que la ARN Polimerasa I (ARN Pol I) transcribe el ARN ribosomal. En cambio, los parásitos del orden Kinetoplástida pueden representar una excepción ya que algunos genes que codifican proteínas son transcriptos por la ARN Pol I.

Por ejemplo, la ARN Pol I transcribe genes que codifican proteínas de membrana, como la glicoproteína variable de superficie en el estadio sanguíneo, y prociclina en el estadio procíclico de *T. brucei* [51; 52–54].

Además, una característica distintiva en cuanto a la organización génica en Tripanosomátidos es que sus genes se encuentran ordenados en unidades de transcripción policistrónicas que se procesan dando ARN mensajeros individuales mediante los procesos de *trans*-splicing y poliadenilación [55]. Estos genes codifican para proteínas que pueden tener funciones no relacionadas, es decir, que no necesariamente están implicadas en una vía metabólica similar [49] **(Figura 7)**.

En consecuencia, la forma en que los Tripanosomátidos regulan la transcripción de genes es peculiar en relación a la mayoría de los eucariotas, y poco se sabe acerca de los mecanismos de control de este proceso [56].

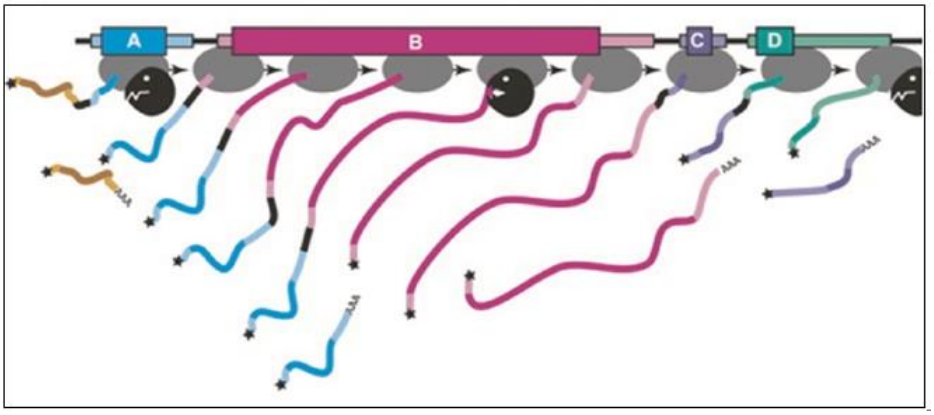

Figura 7. Vía de la formación de ARNm. Se representan cuatro genes en una misma unidad transcripcional. El splice leader se representa como una estrella negra en el extremo 5' de los mensajeros maduros. (*CE Clayton 2014*) [57].

Dada la arquitectura de genes en Tripanosomátidos, muy pocas regiones regulatorias han sido reportadas y la regulación de la expresión génica depende, en gran medida, de mecanismos de control post-transcripcional [56]. La única secuencia promotora reportada hasta el momento en Tripanosomátidos corresponde al promotor del miniexon o splice leader (SL), un ARN de 39 nucleótidos que se une al extremo 5' de cada mensajero por medio de una reacción de esterificación durante el proceso de *trans*-splicing [50; 51; 58; 59].

Si bien se sabe muy poco acerca de la regulación del *trans*-splicing en estos organismos, se han identificado ciertos factores como las proteínas SR y los homólogos de la proteína hnRNP como posibles reguladores de este proceso [60; 61].

Además, la estabilidad, el transporte y la traducción de los mensajeros representan puntos de control muy importantes para la regulación de la expresión de genes en Tripanosomátidos. En este contexto las proteínas de unión a ARN juegan un rol clave en estos organismos, pudiendo mediar estos procesos de regulación post-transcripcional [62].

Proteínas SR

Dado que la regulación de la expresión génica en Tripanosomátidos ocurre principalmente a nivel post-transcripcional, las proteínas de unión a ARN (*RNA Binding Proteins* o RBPs, por sus siglas en inglés) juegan un papel crucial en la regulación de la expresión de genes en estos organismos.

Al unirse al ARN las RBPs pueden mediar procesos tales como el transporte del núcleo al citoplasma, la estabilidad, la degradación, el *trans*-splicing y la traducción de mensajeros [63]. Asimismo, actualmente se asume que ARNs largos no codificantes (lncARNs) pueden participar en el reclutamiento de factores de transcripción o remodeladores de la cromatina, pudiendo modular la funcionalidad de las RBPs con las que interactúan [64]. Estos hallazgos sugieren que los ARNs pueden también regular la funcionalidad de las RBPs [63] **(Figura 8)**.

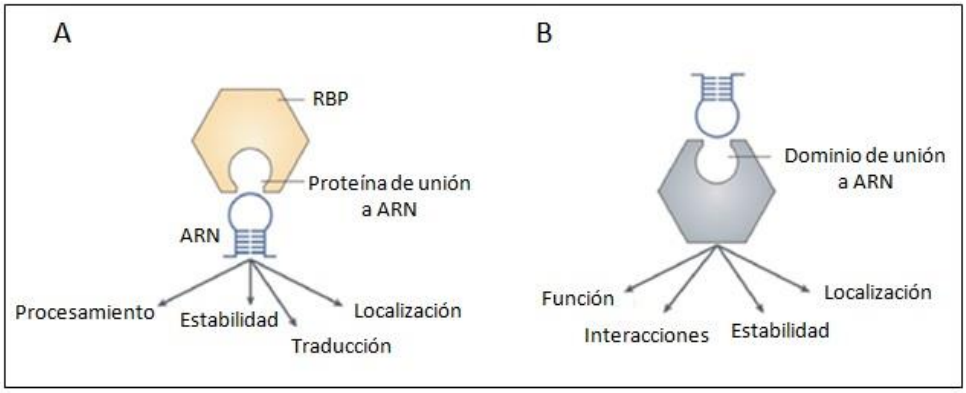

Figura 8. Interacción entre una proteína de unión a ARN y una molécula de ARN.
(A) Una proteína de unión a ARN puede interactuar con el ARN mediante dominios específicos de unión, regulando su metabolismo a través de distintos procesos. **(B)** Asimismo, el ARN puede reclutar factores que modulen la funcionalidad de la RBP. Adaptado de *M.H. Hentze y Col., 2018* [63]

Dentro de las proteínas de unión a ARN se encuentra una familia conservada de proteínas Serina-Arginina (SR). Las proteínas SR constituyen una familia conservada de factores de *splicing* en metazoos que se caracterizan por la presencia de un dominio rico en dipéptidos Arginina/-Serina (dominio RS) en la región carboxilo terminal y uno o dos dominios RRM de unión a ARN [65].

Las secuencias de tipo RRM están conservadas desde levaduras a mamíferos y parecen desempeñar roles importantes en eucariotas superiores [66].

Los dominios RRM determinan la especificidad de unión al ARN, mientras que el dominio RS media las interacciones proteína-proteína que se consideran esenciales para el reclutamiento de la maquinaria de *splicing* [67]; [68]. Las proteínas SR, como factores de *splicing* constitutivo, han sido implicadas en el primer paso de este proceso facilitando la interacción de U1snRNP con el sitio 5' de *splicing* [68].

El genoma de *T. brucei* contiene alrededor de 80 proteínas con dominios RRM, en relación a 497 presentes en humanos [69; 70].

Las proteínas SR se encuentran en metazoos y plantas y la primera en ser reportada fue el factor de *splicing* humano SF2 / ASF, hace casi treinta años [71]. Desde entonces, esta familia de proteínas de unión a ARN ha sido estudiada en diversas especies como factores de *splicing* o reguladores del *splicing* alternativo. Sin embargo, estudios realizados durante la última década han extendido el rol de las proteínas SR a un conjunto diverso de procesos celulares adicionales, como el transporte del ARN del núcleo al citoplasma, la estabilidad y la traducción, entre otros [72; 73; 74]. Actualmente se sabe que las proteínas SR desempeñan múltiples funciones importantes en el control de la expresión génica, y su función no está limitada sólo al proceso de *splicing* [75].

Dentro del grupo de proteínas SR relacionadas se encuentran TbRRM1 (Tb927.2.4710) de *T. brucei* y su ortóloga TcSR62 de *T. cruzi* (TcCLB.511621.50). Ambas proteínas presentan 3 dominios RRM en la región amino terminal, seguido de 2 motivos dedos de zinc y una región rica en dipéptidos (Asp/Glu)-Arg conformando una región de cargas positivas y negativas alternadas que se asemeja a los dominios RS de las proteínas SR. TbRRM1 y TcSR62 presentan entre sí una homología del 70% y una identidad del 55%.

En nuestro laboratorio se comenzó con el estudio de la proteína de unión a ARN TcSR62 de *T. cruzi*. Se demostró que TcSR62 se localiza en el nucleolo en condiciones de estrés transcripcional, junto con otras RBPs y ARNs poliadenilados. Este hallazgo sugirió que el nucleolo podría tener un rol importante en respuesta al estrés, reteniendo factores involucrados en la

regulación de la expresión de genes hasta que se recuperen las condiciones favorables para la célula [76, 77].

Dado que *T. brucei* presenta diversas herramientas moleculares, como el sistema de ARN de interferencia ausente en *T. cruzi*, y que la subespecie *T. brucei. brucei* no es patógena para humanos, se continuó el estudio de este tipo de proteínas mediante la evaluación del rol de la proteína ortóloga de TcSR62 en *T. brucei*, TbRRM1.

TbRRM1

La proteína de unión a ARN TbRRM1 pertenece a la familia de proteínas SR relacionadas y fue descripta hace 20 años por *ID. Manger y JC. Boothroyd* [78] **(Figura 9)**. La proteína se expresa en los estadios procíclico y sanguíneo de *T. brucei* y se localiza en subestructuras dentro del núcleo análogas a "*speckles*", que en eucariotas, se encuentran asociadas al *cis*-splicing. Dada la localización subcelular y su patrón de expresión, TbRRM1 comenzó siendo estudiada como un posible factor de *trans*-splicing, pudiendo cumplir un rol importante en el metabolismo del ARN [78].

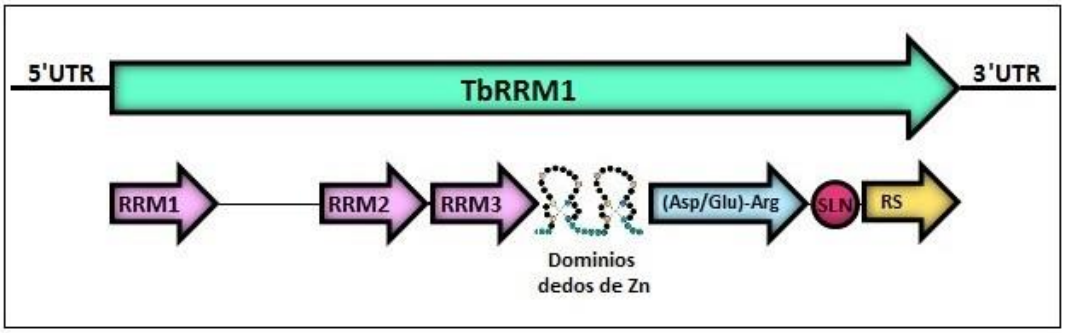

Figura 9. Esquema de los dominios de la proteína de unión a ARN TbRRM1.
RRM: Dominio de unión a ARN. SLN: señal de localización nuclear. RS: repeticiones Arg-Ser.

Recientemente se ha demostrado que los otros dos miembros del grupo de proteínas SR relacionadas (TSR1 y TSR1IP) están implicadas en el *cis y trans*-splicing así como también en la poliadenilación y la estabilidad de mensajeros [79].

Con el objetivo de elucidar la función de TbRRM1, en nuestro laboratorio se estableció un sistema inducible para su silenciamiento por ARNi en el estadio

procíclico de *T. brucei*. Los resultados obtenidos demostraron que TbRRM1 es esencial en el estadio procíclico ya que la curva de crecimiento disminuye significativamente luego de 48 horas de inducida la depleción de la proteína [80]. Además, el silenciamiento de *TbRRM1* produjo la aparición de morfologías aberrantes, entre ellos el fenotipo "*nozzle*" descripto por *E.F. Hendriks y Col.* en 2001 luego de la expresión ectópica de la proteína ZFP2, implicada en diferenciación del estadio sanguíneo al procíclico [81]. Desde entonces, el fenotipo *nozzle* ha sido reportado tanto para el silenciamiento como para la sobreexpresión de diversas proteínas e implica la extensión polarizada de los microtúbulos en el extremo posterior de la célula, demostrado por marcación con un anticuerpo específico para anti-tubulina tirosinada, YL1 / 2, un marcador para microtúbulos recién ensamblados [81; 82; 83]. Además del fenotipo *nozzle*, el silenciamiento de *TbRRM1* produce otras morfologías aberrantes como parásitos anucleados o multinucleados luego de 24 horas de inducida la depleción de la proteína [80].

Por otra parte, mediante ensayos de ARN-Seq realizados por *A. Naguleswaran y Col.* en el estadio procíclico de *T. brucei*, se observó que luego de 48 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1* disminuyen los niveles de un tercio de los transcriptos mientras que los niveles de aproximadamente 300 mensajeros se incrementan, lo que indica la importancia de esta proteína en la regulación de la expresión génica. En particular, los mensajeros de genes localizados en una región particular dentro del cromosoma 9 disminuyen significativamente sus niveles luego del silenciamiento de *TbRRM1* (región denominada PTU-TbNOP86, ya que contiene al gen *TbNop86*). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) contra la histona H3, se demostró que en esta región se ve aumentada la concentración de histona H3 luego de 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1, sugiriendo que podría estar implicada en la remodelación de la cromatina [84].

Por otra parte, ensayos de run-on y posterior PCR cuantitativa llevados a cabo en nuestro laboratorio permitieron demostrar que en la región PTU-TbNop86 ocurre una disminución de la transcripción luego de 24 horas de inducida la depleción de TbRRM1 y que existe una correlación entre la transcripción y los niveles de mensajeros en esta región. Además, mediante ensayos de FAIRE (*Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements*) y ChIP se demostró

que luego de 24 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1*, hay un aumento en la heterocromatina y que TbRRM1 se asocia a la cromatina a lo largo de todo el PTU-NOP86 [85].

En conjunto, estos resultados sugieren que TbRRM1 estaría involucrada en diversos procesos en el estadio procíclico de *T. brucei*, incluida la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar funcionalmente a la proteína de unión a ARN TbRRM1 de *T. brucei* y estudiarla como posible blanco terapéutico para el tratamiento de las Tripanosomiasis.

Objetivos específicos

1) Establecer un sistema estable que permita el silenciamiento de *TbRRM1* en la forma sanguínea de *T. brucei* de manera inducible.

2) Estudiar el efecto de la depleción de la proteína en ambos estadios a nivel morfología, ciclo celular y viabilidad.

3) Analizar el efecto de la sobreexpresión de *TbRRM1* en el estadio procíclico de *T. brucei* en parásitos *wild-type* o depletados de la proteína TbRRM1 endógena.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1) Cultivo de parásitos

1.a) Estadio sanguíneo

Parásitos del estadio sanguíneo de la línea Single Marker (SM), que co-expresan la ARN polimerasa T7 y el represor de tetraciclina (TET) en un mismo vector [86], fueron mantenidos en medio de cultivo HMI-9 (Life Technologies) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Natocor) en estufa gaseada al 5 % CO_2 a 37 °C, en presencia de 1,25 µg/ml de G418 (Gibco).

Parásitos del clon C5 que expresan el ARNi de *TbRRM1* fueron crecidos, además, en presencia de 2,5 µg/ml de higromicina (InvivoGen).

1.b) Estadio procíclico

Parásitos del estadio procíclico de la línea 29.13, que expresan la ARN Polimerasa T7 y el represor de TET [87] fueron mantenidos en medio de cultivo SDM-79 (Life Technologies) suplementado con 10 % de suero fetal bovino en estufa a 28 °C. Estos parásitos fueron crecidos en presencia de los antibióticos higromicina a una concentración final de 50 µg/ml y G418 a una concentración final de 15 µg/m.

Parásitos de la línea 5'UTR que expresan, además, una construcción para el ARNi de *TbRRM1* [80] fueron mantenidos en presencia 50 µg/m de higromicina, 15 µg/ml de G418 y 2,5 µg/ml de phleomicina (InvivoGen).

La línea para la complementación de TbRRM1 fue generada a partir de la cepa 5'UTR y mantenida, además, con 1 µg/ml de puromicina.

La línea de parásitos procíclicos para la sobreexpresión de *TbRRM1* fué generada a partir de la línea 29.13 y mantenida, además, con 1 µg/ml de puromicina (InvivoGen).

2) Curvas de crecimiento

2.a) Estadio sanguíneo

Para las curvas de crecimiento los cultivos fueron contabilizados en cámara de Neubauer e iniciados a una densidad de $1x10^5$p/ml, en presencia de las drogas

de selección. De ser necesario, cada 24 horas los cultivos fueron diluidos a la densidad inicial.

2.b) Estadio procíclico

Para las curvas de crecimiento los cultivos fueron contabilizados en cámara de Neubauer e iniciados a una densidad de $1x10^6$p/ml, en presencia de las drogas de selección. De ser necesario, cada 24 horas los cultivos fueron diluidos a la densidad inicial.

3) Inducción de cultivos con tetraciclina

3.a) Estadio sanguíneo

Para la inducción del silenciamiento de *TbRRM1*, cultivos del estadio sanguíneo fueron inducidos con 1 µg/ml de tetraciclina (TET, Genbiotech) a 12, 24, 48 ó 72 horas a una densidad de $1x10^5$p/ml, en presencia de las drogas de selección. De ser necesario, cada 24 horas los cultivos fueron diluidos a la densidad inicial.

3.a) Estadio procíclico

Para la inducción del silenciamiento de *TbRRM1*, cultivos del estadio procíclico fueron inducidos con 1 µg/ml de TET a 24, 48 ó 72 horas a una densidad de $1x10^6$p/ml, en presencia de las drogas de selección.

La sobreexpresión y complementación de *TbRRM1* fue titulada utilizando 5, 10, 50, 75, 100 ó 1000 ng/ml de TET durante 24 ó 48 horas. De ser necesario, cada 24 horas los cultivos fueron diluidos a la densidad inicial.

4) Cálculo de los tiempos de duplicación

Los tiempos de duplicación (Td) se calcularon teniendo en cuenta las densidades de parásitos contabilizadas mediante cámara de Neubauer a distintos tiempos y concentraciones de TET utilizando la siguiente fórmula:

Td= ln2/k, donde *k* representa la velocidad de crecimiento del cultivo y puede calcularse como: k= -ln(d2/d1)/t2-t1, donde *d* corresponde a la densidad de parásitos y *t* al tiempo.

5) Transfecciones

5.a) Estadio sanguíneo

Se cosecharon para cada transfección $50x10^6$ parásitos de la cepa SM por centrifugación en centrífuga Eppendorf 5804 R a 405 xg en rotor A-4-44 durante 10 minutos a 4 ºC. A continuación, se realizó un lavado con 10 ml de Citomix y se repitió la centrifugación por 10 minutos a 4 ºC. Los parásitos fueron resuspendidos en 400 µl de Citomix por cada transfección. Se colocaron 400 µl de los parásitos en cuba de 0,2 mm de gap (BioRad), junto con 10 µg del ADN. Se realizó un pulso a 1200 V y 186 ohms en un electroporador BTX y luego se transfirieron los parásitos a una botella T25 conteniendo 5 ml de medio de cultivo HMI-9. Luego de aproximadamente 6 horas, los parásitos fueron cultivados en placas de 24 pocillos a una densidad de $1x10^5$ parásitos/ml en presencia de las drogas de selección. Luego de finalizada la selección, los clones fueron transferidos en botella T25 y mantenidos en estufa de CO_2 a 37 °C.

5.b) Estadio procíclico

Se cosecharon para cada transfección $30x10^6$ de parásitos procíclicos de las cepas 29.13 o 5'UTR por centrifugación en centrífuga Eppendorf 5804 R a 720 xg en rotor A-4-44 durante 10 minutos a 4 ºC. A continuación, se realizó un lavado con 10 ml de Citomix y repitió la centrifugación por 10 minutos a 4 ºC. Los parásitos se resuspendieron en 400 µl de Citomix por cada transfección. Se colocaron 400 µl de los parásitos en cuba de 0,4 mm de gap (BioRad), junto con 10 µg del ADN. Se realizaron dos pulsos consecutivos a 1500 V y 240 ohms en electroporador BTX y luego se transfirieron los parásitos a botella T25 conteniendo 5 ml de medio de cultivo SDM-79. Al día siguiente se le agregó la droga de selección correspondiente.

6) Clonado por dilución límite en el estadio procíclico

Las poblaciones de parásitos seleccionadas luego de la transfección fueron clonadas por dilución límite. Para ello se realizó el protocolo de *S. Alsford y Col.*, 2001 [88] con algunas modificaciones. Los parásitos fueron repicados en fase exponencial por aproximadamente tres días y crecidos en medio SDM-79

suplementado con 10 % de suero fetal bovino. A continuación, fueron sembrados en placa de 96 pocillos utilizando las relaciones de 0,1 y 0,25 parásitos por mililitro en 20 % de medio condicionado, obtenido a partir de parásitos de la línea 29.13 crecidos en fase exponencial. Luego de aproximadamente tres semanas, los clones fueron sembrados en placa de 24 pocillos en 1 ml de medio y, luego de recuperado el cultivo, fueron transferidos a botellas de cultivo T25 y mantenidos en estufa a 28 °C.

7) Purificación de ADN genómico de parásitos con DNAZol

Para la purificación de ADN genómico, $100x10^6$ de parásitos del estadio procíclico de *T. brucei* fueron cosechados por centrifugación a 720 xg en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando un rotor A-4-44 por 10 minutos. Luego, se realizó un lavado en Buffer fosfato salino (PBS) en las mismas condiciones de centrifugación, se resuspendió el pellet en 1 ml de DNAzol (Thermo Fisher), y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, se centrifugó a 15700 xg en centrífuga Eppendorf 5415 R utilizando un rotor F 45-24-11 por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. El ADN se precipitó agregando 0,5 ml de etanol 100% centrifugando a 4000 xg en rotor F 45-24-11 por 5 minutos. Se realizaron dos lavados con etanol 70 % centrifugando en las mismas condiciones anteriores y se dejó secar el pellet por 5 minutos. El ADN se resuspendió en 200 µl de NaOH 8 mM (Merck) y se llevó a pH 8 agregando 20,5 µl de HEPES 0,1 M (Sigma). El ADN obtenido fue cuantificado mediante el equipo NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer y por electroforesis en gel de agarosa.

8) Purificación de ARN de parásitos con TRIzol

El ARN total de parásitos fue extraído con el reactivo TRIzol (Life Technologies). Para ello, se cosecharon $100x10^6$ parásitos en fase exponencial a 720 xg para parásitos del estadio procíclico y a 405 xg para el estadio sanguíneo en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando un rotor A-4-44 por 10 minutos a 4°C. Luego fueron resuspendidos en 0,5 ml de TRIzol y almacenados a -70 °C hasta su procesamiento. A continuación, se realizó una extracción con 0,2 ml de cloroformo por ml de TRIzol, se mezcló vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. Se

realizó una centrifugación en centrífuga Eppendorf 5414 R a 12000 xg por 15 minutos a 4 °C y se tomaron 300 µl de la fase superior y se agregaron 0,5 ml de isopropanol por ml de TRIzol. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 xg por 10 minutos a 4 °C. Se realizó un lavado con un ml de etanol 75 % por ml de TRIzol y se centrifugó a 7500 xg por 5 minutos a 4 °C. Se dejó secar el pellet y se resuspendió en 50 µl de agua miliQ autoclavada. La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % utilizando cubas de corrida previamente tratadas con una solución de inactivación de ARNasas (0,1 M NaOH; 0,1 % SDS).

9) Tratamiendo con la enzima ADNasa RQ1

Para el tratamiento con la enzima ADNasa RQ1 (Promega) se agregaron 15 µl de cada ARN junto con 3 µl de ADNasa en el buffer de la enzima. Se incubó en baño térmico por media hora a 37 °C y a continuación se realizó una extracción con cloroformo. Se precipitó la fase acuosa con AcNa 0,3 M (pH 5,2) y etanol 80 %, se incubó por 15 minutos a -20 °C y se realizó una centrifugación a velocidad máxima a 4 °C por 30 minutos. Se realizaron dos lavados con etanol 75 %, se dejó secar el pellet y se resuspendió en 15 µl de agua miliQ autoclavada. Se incubó en baño térmico a 55 °C por 10 minutos y se volvió a cuantificar el ARN obtenido.

10) Reacción en cadena de la Polimerasa

Para el protocolo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron las siguientes concentraciones finales de reactivos: buffer 1X (Invitrogen), $MgCl_2$ 50 mM (Invitrogen), dNTPs 10 mM (Invitrogen) y 0,2 unidades de la enzima Taq ADN Polimerasa Platinum (Invitrogen) ó 0,1 unidades de Taq ADN Polimerasa Platinum High Fidelity (Invitrogen). Se utilizaron 10 ng de templado para plásmidos y 100 ng para ADN genómico. El control negativo se realizó reemplazando el volumen del templado utilizado en la reacción por agua miliQ.

El ciclado se llevó a cabo un termociclador Biometra TProfessional en las siguientes condiciones:

-Desnaturalización inicial: 94 °C por 2 minutos.

-Amplificación:

Desnaturalización: 94 °C por 30 segundos.

Annealing: por 30 segundos (dependiendo la temperatura de melting de los primers utilizados).
Extensión: 72 °C (dependiendo del largo de la región a amplificar, 1 minuto por Kpb para la enzima Taq ADN Polimerasa).
-Extensión final: 72 °C por 10 minutos.

11) Retrotranscripción

La síntesis de la primera cadena de ADNc se sintetizó a partir del ARN total de cada tratamiento utilizando la enzima Transcriptasa Reversa Superscript II (Life Technologies). Brevemente, se combinaron 3 µg de ARN con 200 ng de *random* primers; 0,5 mM de cada dNTP y se realizó la desnaturalización a 65°C por 5 minutos. Luego las muestras fueron inmediatamente colocados en hielo y a continuación se agregó el buffer 1X *first strand* junto con 10 mM DTT y 200 unidades de la enzima Transcriptasa Reversa Superscript II. Las reacciones se incubaron a 42 °C durante 50 minutos y luego a 70 °C por 15 minutos.
Los ciclados se realizaron en un termociclador Biometra TProfessional.

12) PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizó usando el kit *universal Kapa Sybr Fast* (Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems. Los valores de las eficiencias para cada amplicón se obtuvieron mediante el programa LinREG [89] y se analizaron las cantidades relativas de *TbRRM1* y *RPL10A*, normalizadas al ARNr *18S*, mediante el programa REST [90].

13) Preparación de bacterias competentes químicas por el método Inoue

Se prepararon bacterias competentes químicas a partir de una colonia aislada de bacterias *E. coli* DH5αF'IQ, según el protocolo de J. *Sambrook y D. W. Rusell, 2006* [91]. Para ello, se partió de un precultivo en 25 ml de medio SOC en erlenmeyer de 250 ml al que se lo dejó crecer en agitación a 200 rpm por 6 horas a 37 °C. Luego se inocularon tres cultivos de 250 ml en erlenmeyer de 1 litro en medio SOB con 1, 2 ó 4 ml del precultivo inicial. Se incubó en agitación a 18 °C. A la mañana siguiente se midió la DO a 600 nm mediante un espectrofotómetro T60 UV-Visible Spectrophotometer (PG Instruments) y se

seleccionó el cultivo con DO de 0,55. Se transfirió el cultivo al hielo por 10 minutos y luego fue trasvasado a una mamadera estéril de 500 ml y se centrifugó a 2500 xg en centrífuga Sorvall-RC6 Kendro por 10 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 80 ml de medio Inoue y se centrifugó nuevamente a 2500 xg por 10 minutos a 4 °C. El pellet fue resuspendido en 20 ml de Inoue y se le adicionó 1,5 ml de DMSO (Sigma). Se incubó en hielo 10 minutos y luego se realizaron alícuotas de a 100 µl en eppendorf estériles de 1,5 ml sumergiendo inmediatamente los tubos en nitrógeno líquido. Las bacterias fueron almacenadas a -70 °C.

14) Transformación de bacterias competentes químicas por choque térmico

Las transformaciones de bacterias competentes químicas se realizaron por el método de choque térmico. Para ello, se utilizaron 100 µl de bacterias competentes químicas a las que se le agregó el ADN y a continuación se incubó el hielo por 30 minutos. A continuación se realizó el shock térmico transfiriendo los tubos a un baño a 42 °C por 90 segundos e inmediatamente se colocaron en hielo por 2 minutos. Las bacterias fueron recuperadas en 1 ml de LB (Sigma) e incubadas por una hora a 37 °C en agitación a 200 rpm en agitador Orbital Shaker. A continuación, se plaquearon los cultivos en placas de LB agar conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C por una noche.

15) PCR *colony*

En las reacciones de PCR *colony* se utilizaron las mismas concentraciones de buffer, dNTPs, $MgCl_2$, primers y Taq ADN Polimerasa que para las reacciones de PCR tradicional. Como templado, se tomaron con un tip las colonias aisladas a analizar y se las resuspendió el 30 µl de agua miliQ. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se utilizaron 5 µl como templado de la reacción.

16) Purificación de ADN.

16.a) Minipreparación

Se partió de una colonia aislada de bacterias con la construcción deseada a partir de la cual se realizó un cultivo en medio LB suplementado con 100 µg/ml

de ampicilina (Sigma). Luego de una noche de incubación a 37 °C con agitación a 200 rpm en agitador Orbital Shaker se centrifugaron los cultivos de a 1,5 ml en centrífuga Eppendorf MiniSpin utilizando el rotor F-45-12-11, a 2400 xg por 10 minutos. El pellet fue resuspendido con 200 µl de solución de resuspensión P1 conteniendo 100 µg/ml de Ribonucleasa A de páncreas bovino (ARNasa A, Sigma). Se agregaron 300 µl de solución de lisis P2 preparada en el momento y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 300 µl de solución de neutralización P3 y se colocaron los tubos en hielo durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 11300 xg en microcentrífuga Eppendorf MiniSpin utilizando el rotor F-45-12-11 durante 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Posteriormente se realizó una extracción con 400 µl de cloroformo (Merck) y se centrifugó nuevamente a 11300 xg durante 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el ADN plasmídico con 0,7 volúmenes de isopropanol (Merck) incubando a -20 °C por 20 minutos. Luego, se centrifugó a 11300 xg por 15 minutos, se lavó el pellet con 70 % v/v etanol (Merck), y se dejó secar el ADN obtenido por 15 minutos a temperatura ambiente. El pellet fue resuspendido en 32 µl de agua miliQ autoclavada.

16.b) Maxipreparación

La maxipreparación se realizó utilizando el kit Tip100 de Qiagen. Para ello, se realizó un precultivo de una colonia aislada de bacterias conteniendo la construcción deseada en medio LB y se incubó a 37 °C a 200 rpm por 6 horas en un agitador Orbital Shaker. Luego, se inoculó un cultivo de 25 ml de medio LB con una dilución 1/500 del precultivo y se incubó toda la noche a 37 °C a 200 rpm en agitador Orbital Shaker. Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 5400 xg en centrífuga Sorvall-RC6 Kendro utilizando el rotor SLA-1500 durante 10 minutos a 4 °C. El pellet se resuspendió en 4 ml de solución de resuspensión P1 conteniendo 100 µg/ml de ARNasa, y a continuación se agregaron 4 ml de solución de lisis P2 preparada en el momento y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se agregaron 4 ml de buffer de neutralización P3 y se mantuvo durante 15 minutos en hielo. Luego, las muestras fueron transferidas a tubos de polipropileno y centrifugadas a 20000 xg utilizando un rotor SS-34 durante 30 minutos a 4 °C. A continuación,

se trasvasó el sobrenadante a tubos nuevos y se volvió a centrifugar a 20000 xg en rotor SS-34 durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes fueron pasados por columnas de purificación del kit Qiagen Tip100, previamente equilibradas con 4 ml de buffer QBT. Se realizaron dos lavados con 10 ml de solución QC, y el ADN fue recolectado en tubos corex de vidrio en buffer de elución QF. El ADN se precipitó por agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 15000 xg en rotor SS-34 durante 30 minutos a 4 °C. El pellet se lavó con 2 ml etanol 70 % v/v y se centrifugó nuevamente la muestra a 15000 xg en rotor SS-34 durante 10 minutos a 4 ºC. A continuación se realizó una nueva precipitación del ADN resuspendiendo el pellet en 300 µl de buffer Tris-EDTA (TE) junto con 30 µl de AcNa 3 M pH 5,2 (Sigma) y 3 volúmenes de etanol absoluto. La muestra se incubó por 10 minutos a -20 °C y luego se centrifugó a 13000 xg en centrífuga Eppendorf 5415 R utilizando el rotor F 45-24-11 durante 30 minutos a 4 ºC. El pellet se lavó con 500 µl de etanol 80 % v/v, y luego de dejar secar se resuspendió el ADN en 100 µl de TE y se lo conservó a -20 °C.

17) Purificación de ADN a partir de gel de agarosa.

Las muestras a purificar se corrieron en un gel de agarosa ultrapura 1% (SeaKem GTG) en buffer de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE) y luego se cortaron las bandas deseadas con un bisturí. Las muestras fueron purificadas utilizando el kit QIAEX II Gel Extraction Kit de QIAGEN. Para ello, se añadió a cada tubo el buffer QX1 según la relación 3 µl/mg de gel junto con 30 µl de QIAEX II. A continuación, se incubaron los tubos en baño térmico a 50 ºC por 10 minutos y se centrifugaron a 11300 xg en centrífuga Eppendorf MiniSpin utilizando el rotor F 45-12-11 durante 30 segundos. Luego se descartó el sobrenadantes y se realizó un lavado en 500 µl de buffer QX1. Las muestras se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones anteriores y se realizaron dos lavados consecutivos con buffer PE repitiendo las condiciones de centrifugación. Al finalizar los lavados, los tubos se dejaron secar por 30 minutos y el pellet se resuspendió en 20 µl de agua miliQ estéril.

18) Cuantificación del ADN y ARN

18.a) Mediante mediciones de absorbancia

Las muestras de ADN y ARN fueron cuantificadas mediante el equipo NanoDrop One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific). Se midió la absorbancia de las muestras utilizando las longitudes de onda λ_1 260 nm, λ_2 280 nm y λ_3 230 nm. Se consideraron las relaciones λ_1 / λ_2 y λ_1 / λ_3 cercanas a 2.

18.b) Mediante gel de agarosa

Para la cuantificación del ADN y ARN por gel de agarosa, las muestras se corrieron en gel 1 % a 2 volts/cm durante 40 minutos en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE), junto con una muestra de masa conocida. Las cuantificaciones se realizaron mediante el Software ImageJ. Para el caso de la cuantificación de las muestras de ARN, las cubas de corrida fueron tratadas con una solución de inactivación de ARNasas (NaOH 0,1M SDS 0,1%) durante 10 minutos y luego se realizaron lavados con agua miliQ dos veces autoclavada.

19) Construcciones

19.a) Construcción del ARNi de *TbRRM1* para el estadio sanguíneo

Para la construcción del ARNi de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo se utilizó el vector P2T7^{TAblue} (Dr. D. Horn) [92] inducible por tetraciclina **(Figura 10)**.

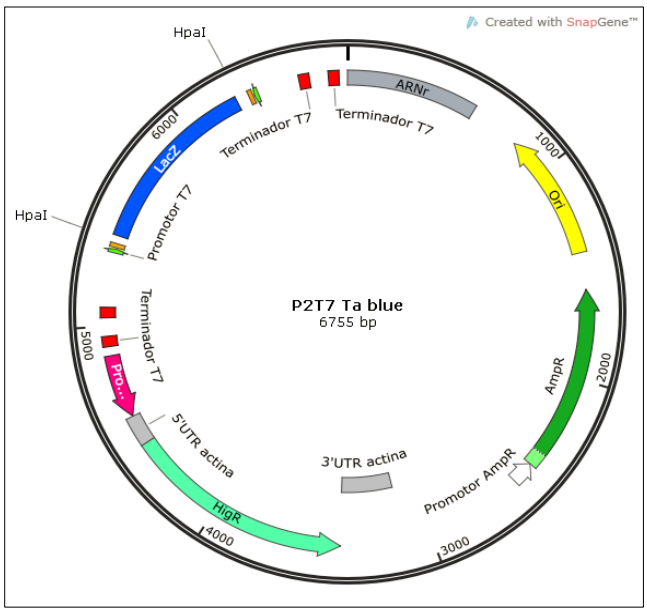

Figura 10. Mapa del vector utilizado para el silenciamiento de TbRRM1 en el estadio sanguíneo. El vector P2T7^{TAblue} posee resistencia a higromicina, sitio de integración en la región ribosomal del genoma del parásito y dos promotores T7 enfrentados inducibles por TET, entre los cuales se clonó una región de 424 pb correspondiente al 5'UTR de TbRRM1.

El vector P2T7^{TAblue} permite un clonado “TA” universal, y se utilizó esta estrategia desarrollada por *M. Y. Zhou y C. E. Gomez-Sanchez* en 2000 [93], con algunas modificaciones.

A continuación se describe la estrategia para la preparación del inserto y del vector para el clonado TA universal, resumido en la **Figura 11**.

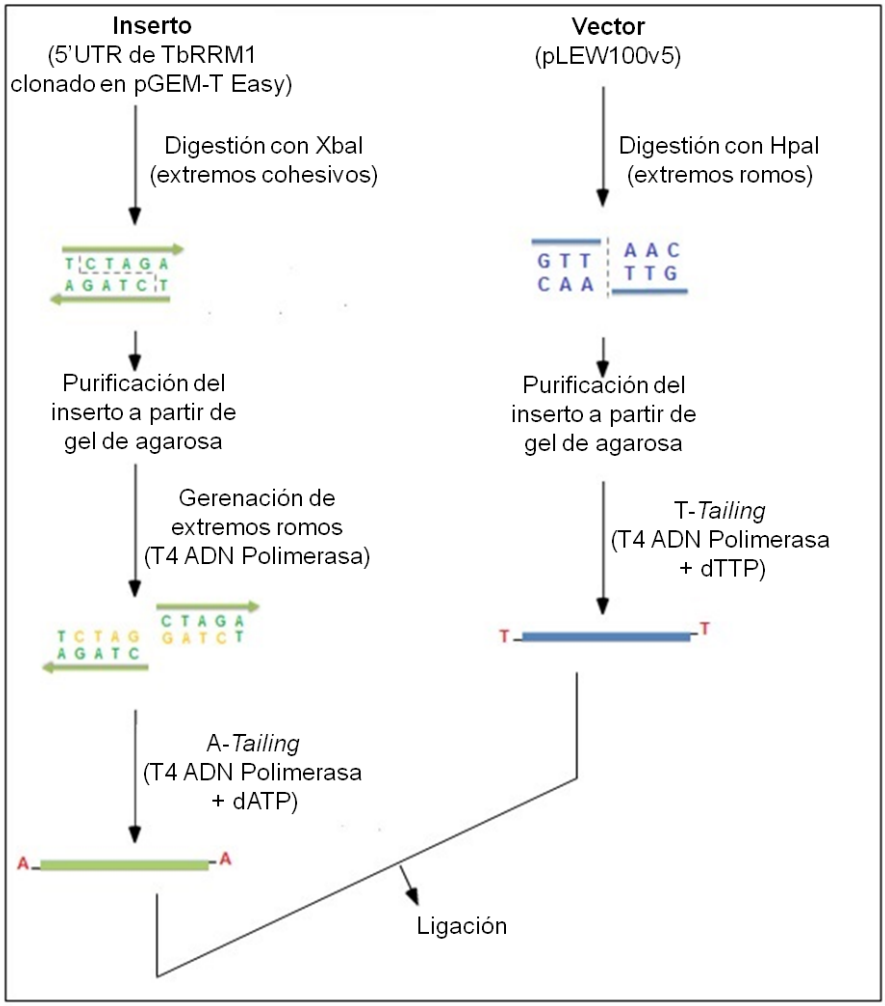

Figura 11. Estrategia para el clonado TA universal. Esquema que resume la preparación del inserto y del vector para la generación del ARNi de *TbRRM1* mediante la estrategia de clonado TA universal.

Preparación del inserto:

El inserto correspondiente a 424 pb de la región 5'UTR de TbRRM1, clonado en el vector pGEM-T Easy (Promega), fue digerido con la enzima de restricción XbaI (New England BioLabs) y luego se realizó la purificación de la banda del inserto a partir de gel de agarosa. Dado que XbaI produce extremos cohesivos,

se realizó una técnica para generar extremos romos como se describe a continuación:

19.ai) Generación de extremos romos

Se incubó el inserto correspondiente al 5'UTR de TbRRM1 digerido con la enzima XbaI y purificado de gel, con 1 mM dNTPs y 6 unidades de la enzima T4 ADN Polimerasa (Invitrogen). Se incubó a 11 °C por 20 minutos en termociclador Biometra TProfessional y se agregaron 2 µl de EDTA 0,5 M (Sigma) para detener la reacción.

19.aii) A-*Tailing*

El ADN proveniente del paso anterior se incubó con el buffer de PCR, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dATP y 5 unidades de la enzima Taq ADN Polimerasa (Invitrogen). Se incubó a 72 °C por 30 minutos en termociclador Biometra TProfessional.

Preparación del vector:

El vector $P2T7^{TAblue}$ fue digerido con la enzima de restricción HpaI (New England BioLabs), la cual genera extremos romos. Luego, se realizó la purificación a partir de gel de agarosa y se adicionaron extremos "T" salientes como se describe a continuación:

19.aiii) T-*Tailing*

El vector digerido y purificado de gel se incubó con el buffer de PCR; 2,5m M $MgCl_2$; 1 mM dTTP y 5 unidades de Taq ADN polimerasa a 72°C por dos horas en termociclador Biometra TProfessional. Luego se realizó una extracción con cloroformo y precipitación con 3 M de acetato de sodio pH 5,2 y etanol.

19.b) Construcción para la sobreexpresión de *TbRRM1* en el estadio procíclico

Para la sobreexpresión de *TbRRM1* en el estadio procíclico, se realizó la construcción en el vector pLEW100v5 inducible por TET (Lab. Dr. George Cross, no publicado. Modificado por el Dr. L. Bouvier) **(Figura 12)**. En el laboratorio, contamos con una cepa de parásitos del estadio procíclico que tiene en uno de sus alelos a la proteína TbRRM1 etiquetada con 3xFLAG en el extremo amino terminal.

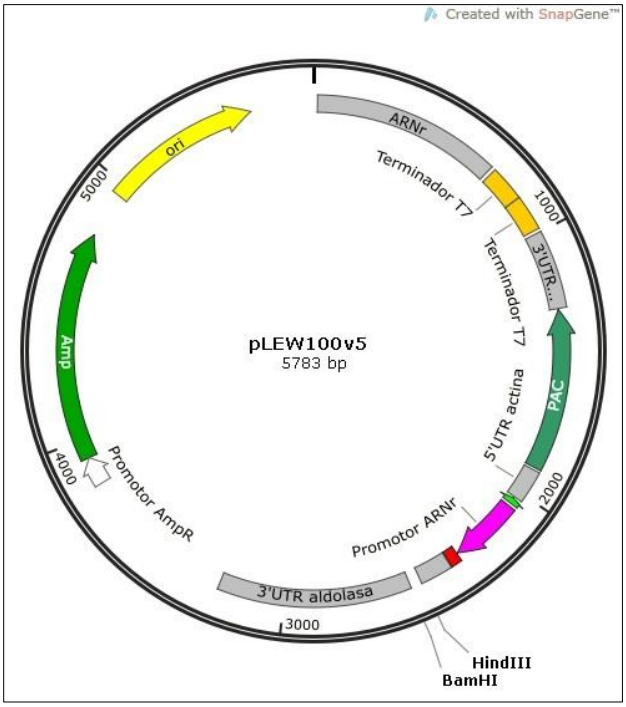

Figura 12. Mapa de vector utilizado para la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*.

El vector pLEW100v5 tiene un promotor ribosomal, inducible por tetraciclina en el que se clonó la proteína TbRRM1 etiquetada con 3xFLAG en su extremo amino terminal.

Se realizó la extracción de ADN genómico de estos parásitos mediante el protocolo de DNAzol y se lo utilizó como templado para amplificar mediante PCR la región correspondiente a 3xFLAG-TbRRM1 de 1389 pb. La PCR se realizó empleando una Taq ADN Polimerasa de alta fidelidad (Taq Platinum High Fidelity, Invitrogen). Luego se realizó el clonado en el vector pGEM-T Easy, la secuenciación y el subclonado en el vector pLEW100v5 con las enzimas de restricción BamHI y HindIII.

20) Ligación

20.a) Reacciones de ligación generales.

Se realizaron relaciones inserto:vector de 1:1, 3:1 y 9:1 junto con el control de vector religado (sin inserto). Se utilizó el kit de la enzima T4 ADN Ligasa (New England BioLabs). Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 10 µl con agua miliQ autoclavada y fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente y luego se conservaron durante toda una noche a 4 °C.

Al día siguiente se realizó la transformación de bacterias químicas competentes con los productos de la ligación mediante la técnica de choque térmico.

20.b) Ligación en el vector pGEM-T easy

Para la ligación en el vector pGEM-T Easy se realizaron relaciones inserto:vector de 1:1, 3:1 y 9:1 junto con un control de vector religado (sin inserto) y un control positivo utilizando el inserto control provisto por el kit pGEM-T Easy (Promega). Las reacciones se ajustaron a un volumen final de 10 µl con agua miliQ autoclavada, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y se conservaron durante toda una noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó la transformación de bacterias químicas competentes con los productos de la ligación mediante la técnica de choque térmico.

21) Detección de colonias transformadas por medición de la actividad de β-galactosidasa.

El vector pGEM-T Easy permite la detección de colonias transformantes mediante la medición de la actividad β-galactosidasa ya que, en la ligación, el inserto se integra dentro de este gen. Para determinar si las bacterias transformadas con el vector pGEM-T Easy contienen el inserto, se realizó el plaqueo en placas de LB-agar en presencia de 100 µg/ml de ampicilina más IPTG (Promega) y X-gal (Sigma) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Las colonias de bacterias transformantes presentaron colon blanco, dado por la interrupción del gen β-galactosidasa mientras que las no transformantes presentaron color azul dado por actividad de la enzima presente en el plásmido.

22) Secuenciaciones de ADN

Las secuenciaciones de ADN fueron realizadas utilizando los servicios de secuenciación de Macrogen, con secuenciadores Applied Biosystems 3730X.

Las secuencias fueron analizadas utilizando la aplicación bioinformática “Benchling” (https://benchling.com).

23) Western blot

Las muestras a correr fueron resuspendidas en buffer de craqueo y hervidas durantes 5 minutos. Luego, los lisados fueron sembrados en gel de poliacrilamida-bisacrilamida 29:1 al 12 % y corridos en cubas de corrida vertical

Mini Protean (BioRad). La electroforesis se realizó a 120 V por aproximadamente una hora y media. Luego de finalizada la corrida, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Amersham HybondTM- ECL, GE Healthcare) durante 2 horas a 0,2 A en una cuba MiniProtean II (BioRad).
A continuación se realizó la tinción con rojo ponceau (5 % p/v) en ácido acético 1 % (v/v) para verificar la correcta transferencia de las proteínas. Luego de un lavado en Buffer Tris salino (TBS), se realizó el bloqueo en TBS 5 % leche durante toda la noche en cámara fría a 4 °C.
Luego se lavó con TBS 0,05% Tween 20 (Sigma) y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS 1 % leche por una hora a temperatura ambiente. A continuación, luego de tres lavados con TBS 0,05 % Tween, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente también diluido en TBS 1 % leche por 1 hora a temperatura ambiente. La detección de proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) y la señal emitida fue detectada mediante placas radiográficas (AGFA).

24) Inmunofluorescencia indirecta

24.a) Estadio sanguíneo

Para el estadio sanguíneo, $7x10^6$ parásitos fueron cosechados por centrifugación a 405 xg en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando el rotor A-4-44 por 10 minutos y luego lavados en PBS suplementado con 1 % glucosa (PSG). Se realizó la fijación en paraformaldehído 4 % (PFA, Electron microscopy sciences) por 15 minutos a temperatura ambiente y luego de un lavado en PBS, se colocaron las muestras en un cubreobjetos previamente tratados con 0,25 mg/ml Poly-L-lisina (Sigma) por media hora a temperatura ambiente.
A continuación, se agregó 25 mM NH_4Cl (Sigma) y se incubó por 10 minutos. Luego de un lavado con PBS se realizó la permeabilización con 0,3 % Tritón X-100 (Sigma) por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego de un lavado con PBS y se incubó con solución de bloqueo conteniendo 3 % BSA (Fedesa) y
5 % suero normal de cabra (Sigma) en PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo primario

correspondiente por 1 hora en estufa a 37 °C en cámara húmeda. Luego del lavado de los vidrios con PBS, se incubó con el anticuerpo secundario en las mismas condiciones. A continuación se realizó un lavado en PBS y los vidrios fueron montados en líquido de montaje FluorSave (Merck) y 1 µg/ml de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen). Las muestras se guardaron en heladera y fueron analizadas en un microscopio Nikon Eclipse 80i utilizando los filtros adecuados.

24.b) Estadio procíclico

Para el estadio procíclico de se procedió de la misma manera que para el estadio sanguíneo pero las centrifugaciones se realizaron a 720 xg en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando el rotor A-4-44 por 10 minutos y una vez centrifugados los parásitos, se lavó el pellet con PBS. La permeabilización se realizó con 0,5 % de saponina en solución de bloqueo (2 % BSA, 2 % suero normal de cabra) y se incubó por una hora a temperatura ambiente.

25) Cuantificación de las configuraciones de núcleos y kinetoplastos y análisis morfométricos de las distancias núcleo/kinetoplasto y kinetoplasto/posterior.

Parásitos del estadio procíclico fueron fijados con PFA al 4 % y teñidos con DAPI a una concentración final de 1 µg/ml. Se evaluaron las configuraciones núcleo/kinetoplasto, las morfologías de los parásitos y las distancias desde el centro del núcleo (N) hacia el centro del kinetoplasto (K), así como desde el K hasta el extremo posterior (P). Los parásitos se examinaron bajo el microscopio Nikon 80i LED y se analizaron mediante el software ImageJ.

Para el caso de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*, los parásitos fueron considerados *nozzle* cuando su distancia KP fue mayor que dicha distancia para el control sin tratar más 2 desvíos estándar. Dicho valor fue de 3,6 µm.

26) Ensayo de viabilidad por marcación con Rhodamina123 e Ioduro de propidio

Para la marcación con Rhodamina123 (Rho123, Life Technologies) se centrifugaron los parásitos a 405 xg en el caso de sanguíneos y a 720 xg en el caso de procíclicos en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando un rotor A-4-44

por 10 minutos a 4 °C. Se realizó un lavado con buffer PSG y se resuspendió en 1ml de PSG+250 µM de Rho123. Se realizó una incubación por 20 minutos a 28 °C en el caso de procíclico y a 37 °C para sanguíneos y a continuación se realizó un lavado con PSG. Las muestras fueron resuspendidas en 1 ml de PSG y la marca de Rhodamina123 se analizó por citometría de flujo en el canal FL-1 utilizando un citómetro Partec. Para la incorporación de ioduro de propidio (IP, Invitrogen), se añadió 1 µg/ml del reactivo 5 minutos antes del análisis por citometría de flujo. Se adquirieron un total de 50.000 eventos en una población de células previamente establecida basados en los parámetros FSC y SSC.

27) Cálculo del porcentaje de parásitos con potencial de membrana mitocondrial disminuído

Para determinar el porcentaje de parásitos con potencial de membrana mitocondrial (Ψ) disminuído, se calculó mediante el programa FlowJo la intensidad de fluorescencia media de FL-1 excluyendo las poblaciones positivas para Rho123.

28) Ensayo de marcación con Anexina V-FITC e ioduro de propidio en el estadio sanguíneo

Para la marcación de Anexina V-FITC e IP se utilizó el kit de BioLegend.

Parásitos del estadio sanguíneo inducidos a distintos tiempos con TET fueron centrifugados a 405 xg en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando un rotor A-4-44 por 10 minutos y lavados dos veces en buffer de tinción (*BioLegend cell staining buffer*). A continuación, se resuspendió cada muestra en 100 µl de Buffer de *binding* de Anexina V y se agregó a cada tubo 5 µl de Anexina V-FITC y 10 µl de Ioduro de propidio. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 30 minutos y luego se llevaron a 1 ml en buffer de binding de Anexina V. A continuación las muestras fueron analizadas por citometría de flujo mediante un citómetro Partec CyFlow Space en los canales FL-1 y FL-2. El porcentaje de parásitos marcados con Anexina V-FITC e IP fueron analizados utilizando el programa FlowJo (Tree Star Inc.).

29) Ciclo celular por citometría de flujo

29.a) Estadio sanguíneo

Para el ensayo de ciclo celular por citometría de flujo, $5x10^6$ parásitos del estadio sanguíneo fueron centrifugados a 405 xg en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando un rotor A-4-44 por 10 minutos. Se realizó un lavado en buffer PSG centrifugando en las mismas condiciones y a continuación se resuspendió el pellet en buffer fosfato hipotónico 0,1 M conteniendo 6 µM digitonina (Sigma) y 10 µg/ml de ioduro de propidio. El contenido de ADN fue analizado utilizando el citómetro Partec CyFlow Space en el canal FL-2 lineal. El porcentaje de parásitos en cada fase fue analizado utilizando el programa FlowJo (Tree Star Inc.). Las regiones correspondientes a cada fase del ciclo celular se establecieron manualmente y los valores obtenidos para los tratamientos con TET fueron comparados con los obtenidos sin el inductor.

29.b) Estadio procíclico

Para el ensayo de ciclo celular por citometría de flujo, $5x10^6$ parásitos del estadio procíclico fueron centrifugados a 720 xg en centrífuga Eppendorf 5804 R utilizando un rotor A-4-44 por 10 minutos y lavados dos veces en PBS-2 mM EDTA frío. Luego, el pellet fue resuspendido en 300 µl de PBS-2 M EDTA y se agregaron 700 µl de metanol absoluto frío. Se incubaron las muestras a 4 °C toda la noche. Luego, se realizaron dos lavados en PBS-2 mM EDTA en centrífuga Eppendorf 5415 R a 400 xg utilizando un rotor F 45-24-11 por 10 minutos a 4 °C. A continuación las muestras fueron resuspendidas en una solución conteniendo 0,2 µg/ml ARNAsa A y 50 µg/ml de ioduro de propidio en PBS-2 mM EDTA y se incubó a 37 °C por media hora. El contenido de ADN fue analizado utilizando el citómetro Partec CyFlow Space en el canal FL-2 lineal. El porcentaje de parásitos en cada fase fue analizado utilizando el programa FlowJo (Tree Star Inc.). Las regiones correspondientes a cada fase del ciclo celular se establecieron manualmente y los valores obtenidos para los tratamientos con TET fueron comparados con los obtenidos sin el inductor.

Resultados

Resultados

A) Localización subcelular de TbRRM1 por inmunofluorescencia indirecta en el estadio sanguíneo de *T. brucei*.

Con el objetivo de caracterizar la proteína de unión a ARN TbRRM1 en el estadio sanguíneo, se comenzó estudiando en primer lugar su localización subcelular. Previamente, en nuestro laboratorio se estudió la localización subcelular de TbRRM1 en el estadio procíclico mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se determinó mediante esta técnica que TbRRM1 se localiza en el núcleo en parásitos de este estadio [78, 80], más específicamente en dominios denominados "*speckles*" por *J. Swanson Beck* en 1961 [94]. Estas estructuras contienen pequeñas ribonucleoproteínas y han sido vinculadas al proceso de *splicing* [95].

Para determinar la localización subcelular de TbRRM1 en el estadio sanguíneo, se realizó una IFI utilizando un suero que reconoce específicamente a la proteína de estudio. Al analizar las fotografías se observó que la localización subcelular de TbRRM1 en el estadio sanguíneo es mayoritariamente nuclear, sin embargo hay una proporción minoritaria de la proteína en el citoplasma a diferencia de lo que ocurre en el estadio procíclico **(Figura 13)**.

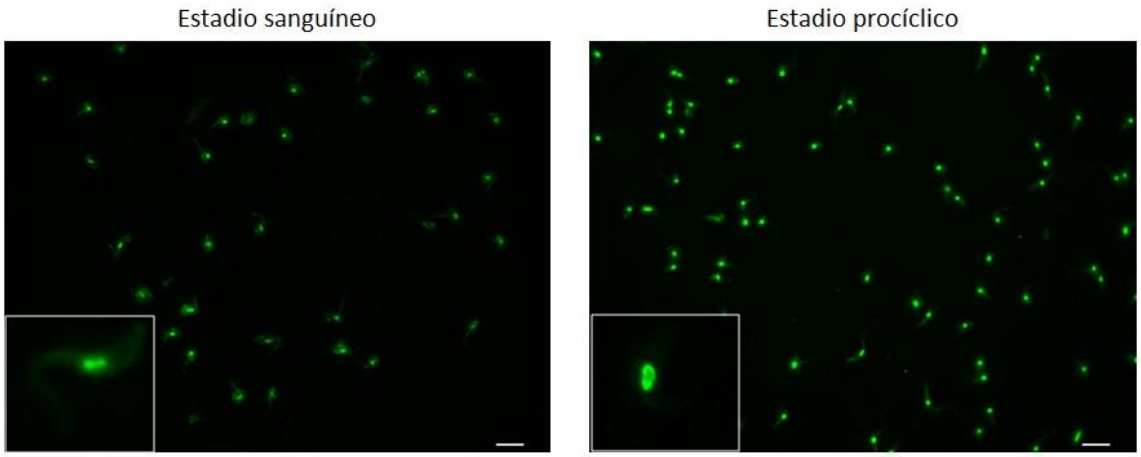

Figura 13. Localización subcelular de TbRRM1 en los estadios sanguíneo y procíclico. Fotografías de IFI en parásitos permeabilizados de los estadios sanguíneo (izquierda) y procíclico (derecha). Las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse 80i a 400 milisegundos de exposición. Aumento: 60x. Barra de escala: 10 µm.

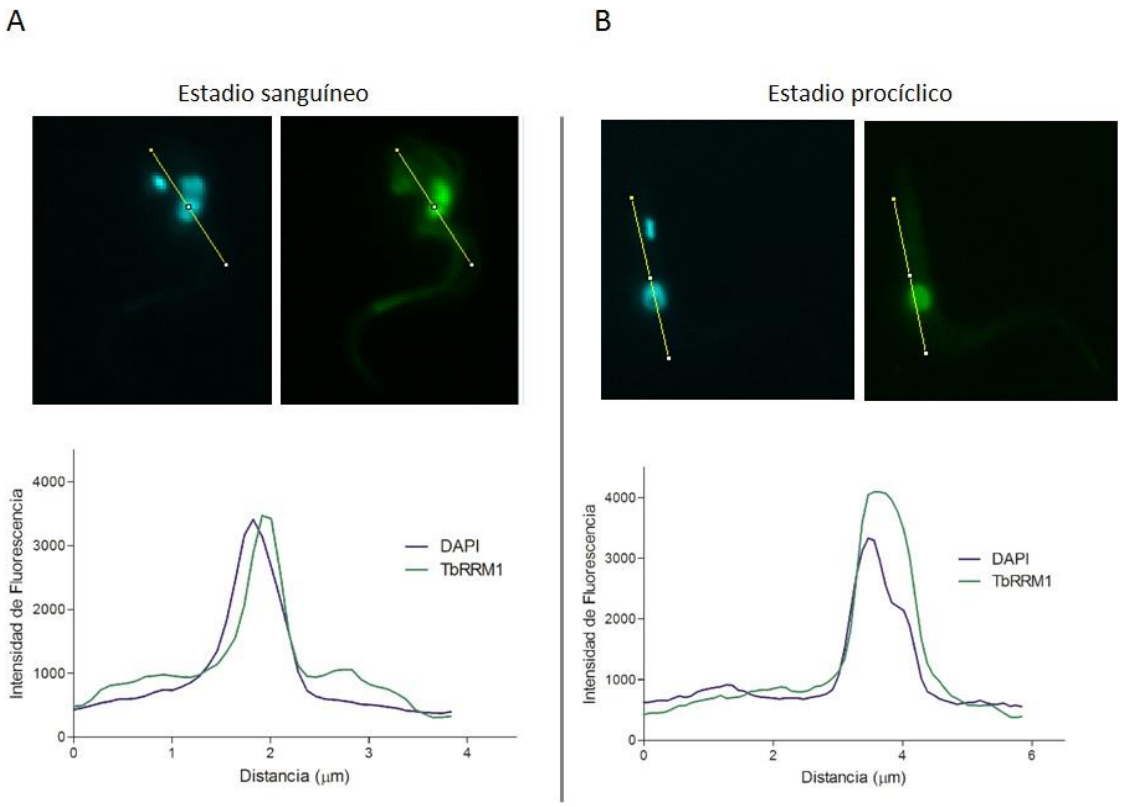

Figura 14. Comparación de la intensidad de fluorescencia de TbRRM1 en parásitos de los estadios sanguíneo y procíclico de *T. brucei*. Fotografías de parásitos de los estadios sanguíneo **(A)** y procíclico **(B)**. Debajo de cada panel se observan los histogramas correspondientes a la intensidad de fluorescencia para DAPI (azul) y TbRRM1 (Verde) de acuerdo a la línea trazada a lo largo de cada parásito. Se muestra para cada estadio un histograma representativo de 20 parásitos analizados.

Para evaluar la intensidad de fluorescencia, se trazó una línea a lo largo de todo el parásito y, mediante el software ImageJ se graficaron las intensidades de fluorescencia en función de la distancia en parásitos de los estadios sanguíneo y procíclico. En los histogramas se observó que la fluorescencia de TbRRM1 en procíclicos se encuentra restringida al núcleo mientras que en parásitos del estadio sanguíneo se localiza, además, en el citoplasma **(Figura 14)**.

La presencia de TbRRM1 en el citoplasma de parásitos del estadio sanguíneo junto con su localización restringida al núcleo en parásitos procíclicos puede sugerir que la proteína tendría funciones adicionales en el estadio del mamífero.

B) Efecto del silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo de *T. brucei*.

Previamente en nuestro laboratorio se estudió el efecto del silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio procíclico de *T. brucei*, demostrando que es esencial ya que su depleción produce fenotipos aberrantes, afecta la progresión normal del ciclo celular y desencadena la muerte de los parásitos por apoptosis [80].

Dados estos antecedentes, se decidió estudiar el efecto del silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo, comenzando por establecer un sistema estable para el silenciamiento condicional del gen de la proteína TbRRM1.

B.1) Silenciamiento por ARNi de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo de *T. brucei*.

El silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo se llevó a cabo mediante la técnica de ARN de interferencia (ARNi). La construcción para generar el ARNi de *TbRRM1* se realizó en el vector P2T7^{Tablue} [92] inducible por tetraciclina (TET) el cual permite realizar un clonado “TA” universal [93]. En este vector se realizó el clonado de la región correspondiente a 424 pb del 5’UTR de TbRRM1, adaptando la técnica de clonado “TA” universal a nuestro sistema **(Figura 15)**.

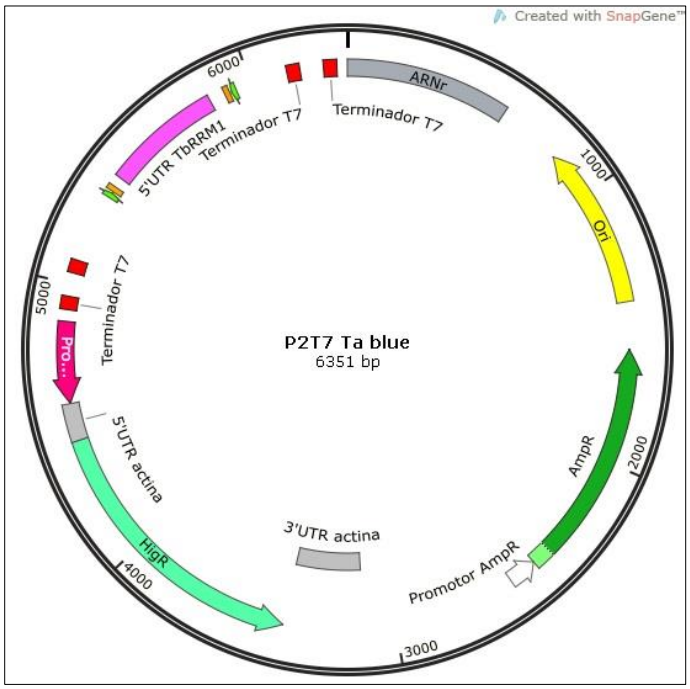

Figura 15. Construcción para el silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo. La región correspondiente a 424 pb del 5’UTR de TbRRM1 fue clonada en el vector P2T7^{TAblue} inducible por tetraciclina, entre dos promotores T7 enfrentados. El vector confiere resistencia a higromicina y se integra en la región ribosomal del genoma del parásito.

Los parásitos del estadio sanguíneo de la cepa Single Marker fueron transfectados con dicha construcción y, luego de la selección, se obtuvieron dos clones denominados C5 y B4. Se decidió continuar con el clon C5.

En primer lugar se analizó el silenciamiento de *TbRRM1* mediante la medición de los niveles de ARNm por PCR en tiempo real (qRT-PCR) en cultivos control (TET-) o luego de 12 ó 24 horas de inducido el ARNi de *TbRRM1* (TET+). Se midió el ARNm de *TbRRM1* y el mensajero de la proteína ribosomal 60s L10a *(RPL10A,* ID: Tb927.11.9710*)*, cuyo nivel no se ve afectado por la depleción de TbRRM1 en el estadio procíclico [84]. Se utilizó el ARN ribosomal *18S* (Tb427.02.1931) como control endógeno.

Los resultados de qRT-PCR para tres réplicas biológicas independientes demostraron que luego de 12 horas del agregado de 1 µg/ml de TET el nivel de ARNm de *TbRRM1* disminuye 2,4 veces mientras que el ARNm de *RPL10A* no se ve afectado. Luego de 24 horas del agregado del inductor el mensajero de *TbRRM1* disminuye aproximadamente 4 veces **(Figura 16 A)**.

A continuación, para evaluar los niveles de proteína TbRRM1, se realizó un western blot y ensayos de IFI en cultivos sin inducir (TET-) y luego de 12 ó 24 horas del agregado de 1 µg/ml de tetraciclina (TET+). Mediante el western blot se observó la depleción de la proteína a partir de las 12 horas post-inducción **(Figura 16 B)**. Mediante la cuantificación de la inmunofluorescencia indirecta de tres réplicas biológicas independientes se determinó que el silenciamiento de *TbRRM1* ocurre en el 96,5 % de los parásitos luego de 12 horas de inducido el ARNi, y luego de 24 horas menos del 3 % de la población total expresa TbRRM1 **(Figura 16 C** y **D)**, demostrando una penetrancia casi completa del ARNi luego de 12 horas del agregado de TET.

Los resultados obtenidos permitieron validar el sistema de ARNi para el silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo de *T. brucei* mediante tres técnicas diferentes.

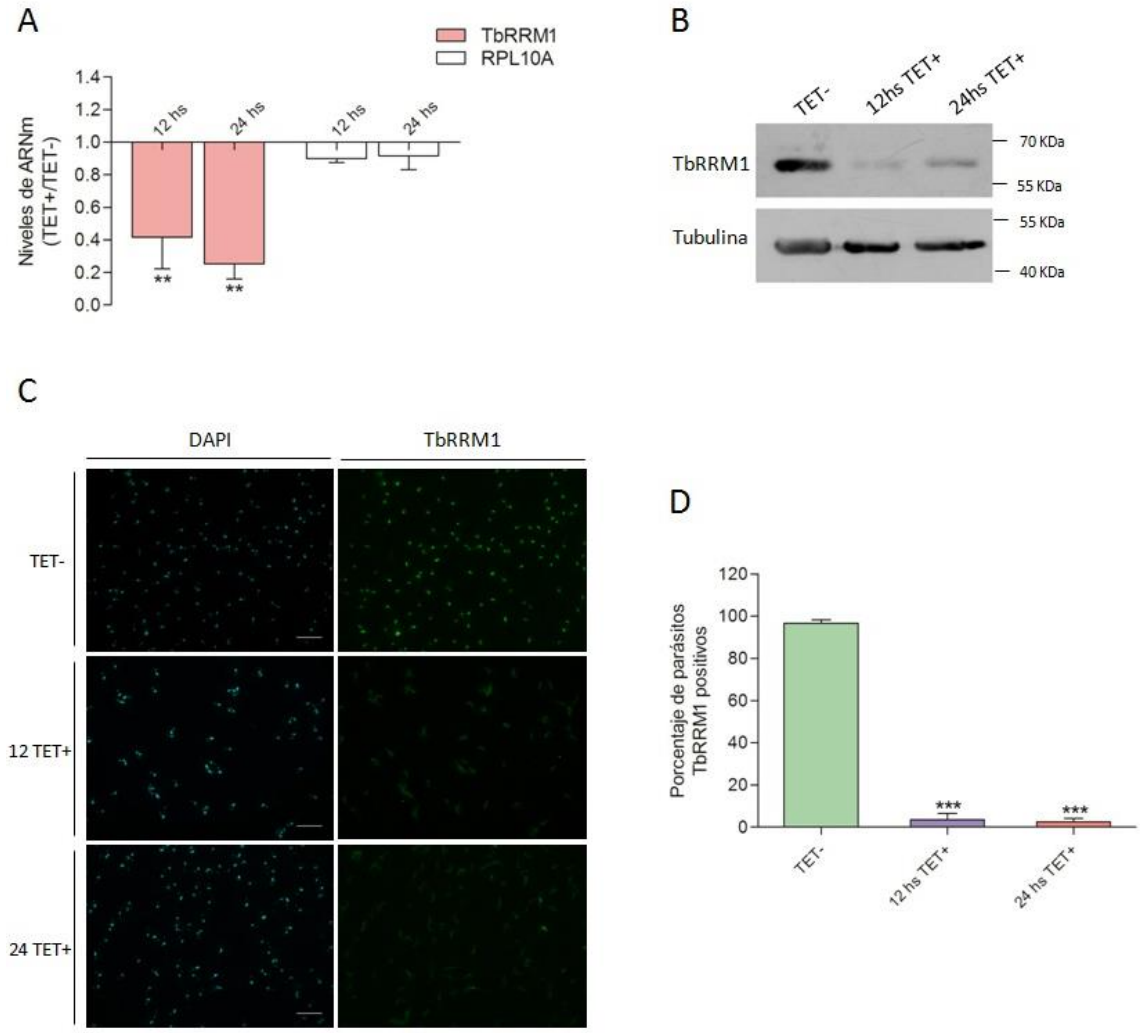

Figura 16. Validación del sistema para el silenciamiento de *TbRRM1* en parásitos del clon C5 del estadio sanguíneo. (A) Cambio en los niveles de los ARNm de *TbRRM1* y *RPL10A* medidos por qRT-PCR, graficados como TET+/TET-. Los valores fueron relativizados al ARNm *18s.* Las barras de error indican el desvío estándar con respecto a la media de, al menos, tres réplicas biológicas independientes. Los datos fueron analizados con el Test *t* de Student, comparados con el valor hipotético de 1. **(B)** Western blot luego de 12 y 24 horas de inducida la depleción de TbRRM1. **(C)** Fotos de IFI a 12 y 24 horas del agregado de TET (Barra de escala: 10 µm) y su respectiva cuantificación **(D)** correspondiente a tres réplicas biológicas independientes contabilizando más de 200 células por réplica. Test *t* de student **p<0,01; ***p<0,001.

B.2) Curva de crecimiento en parásitos del estadio sanguíneo de *T. brucei* depletados de TbRRM1

Una vez corroborado el silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo, nos propusimos estudiar el crecimiento en parásitos depletados de la proteína. Para ello, se evaluó la curva de crecimiento por conteo en cámara de Neubauer a las 12, 24, 48 y 72 horas luego del agregado de TET.

Cada 24 horas, los parásitos fueron contabilizados y diluidos a la densidad inicial de $1x10^5$ parásitos/ml, para mantener los cultivos en fase exponencial durante todo el ensayo. El análisis de la curva de crecimiento celular de, al menos tres réplicas biológicas independientes para cada punto, mostró que TbRRM1 es esencial en el estadio sanguíneo, ya que la densidad de parásitos disminuye significativamente luego de 12 horas del agregado del inductor **(Figura 17 A)**, lo que sugiere que la proteína TbRRM1 juega un rol crucial en este estadio, al igual que lo visto previamente en parásitos procíclicos [80; 84].

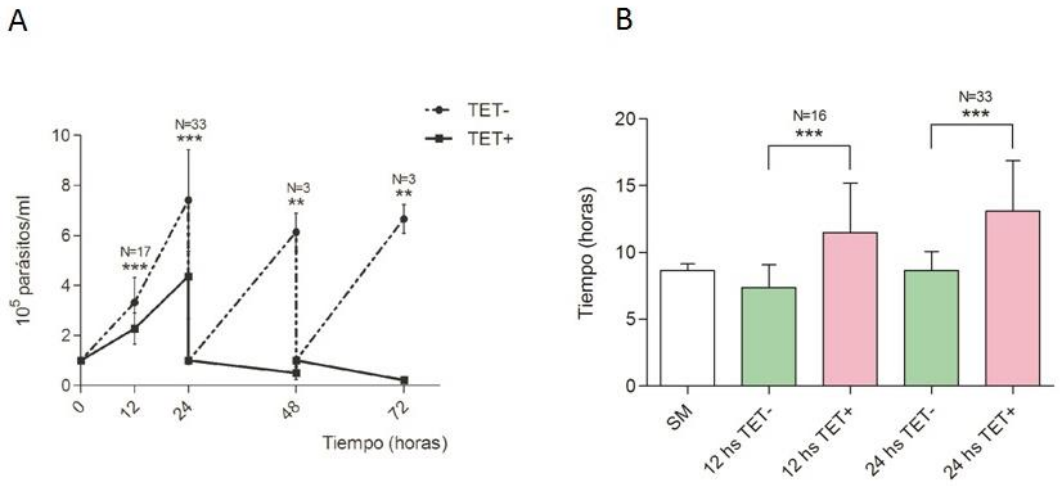

Figura 17. Efecto del silenciamiento de *TbRRM1* en el crecimiento de parásitos del clon C5 del estadio sanguíneo. (A) Curva de crecimiento luego de la inducción del ARNi de *TbRRM1*. **(B)** Tiempos de duplicación (Td) a 12 y 24 horas de inducción calculados a partir de la siguiente fórmula: Td= ln2/k, donde *k* representa la velocidad de crecimiento del cultivo y puede calcularse como: k= -ln (d2/d1)/t2-t1, donde *d* corresponde a la densidad de parásitos y *t* al tiempo. Las barras de error indican el desvío estándar con respecto a la media de tres o más réplicas biológicas independientes. Test *t* de student en comparación con las muestras TET- **p<0,01; ***p<0,001.

Además, a partir de los valores obtenidos de la densidad de parásitos en cada condición, se calcularon los tiempos de duplicación en cultivos de la cepa parental Single Marker (SM) y del clon C5 sin inducir y luego de 12 ó 24 horas de inducida la depleción de TbRRM1. Se observó un aumento en el tiempo de duplicación de 8,4 a 10,9 ó 14,4 horas luego de 12 ó 24 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1*, respectivamente **(Figura 17 B)**.

El aumento observado en los tiempos de duplicación sugiere que habría un retraso en la división de los parásitos, indicando un defecto en la progresión normal del ciclo celular, o bien, una pérdida de parásitos por muerte celular.

B.3) Ensayo de viabilidad por marcación con Rhodamina123 e Ioduro de propidio en los estadios procíclico y sanguíneo de *T. brucei*.

Dado que la depleción de TbRRM1 afecta la curva de crecimiento de los parásitos en ambos estadios, se decidió estudiar si el efecto en la curva de crecimiento se debe a la pérdida de parásitos por muerte celular.

Para ello, parásitos sin inducir o inducidos por distintos tiempos fueron incubados con Rhodamina123 (Rho123). Rho123 es un colorante catiónico verde fluorescente que es permeable a la membrana celular y se metaboliza en las mitocondrias activas [96]. En paralelo se realizó la incubación con ioduro de propidio (IP), que se incorpora en las células cuya membrana plasmática se encuentra dañada [97].

El análisis por citometría de flujo luego de la marcación con Rho123 e IP para el estadio sanguíneo, mostró una disminución significativa en el porcentaje de parásitos que incorporaron Rho123 y un aumento de la población IP positiva luego de 48 horas de inducción del ARNi de *TbRRM1* **(Figura 18)**.

Este resultado sugiere que, a pesar de que la curva se ve afectada a partir de las 12 horas del agregado de TET **(Figura 17 A)**, los parásitos comienzan a morir a partir de las 48 horas post-inducción.

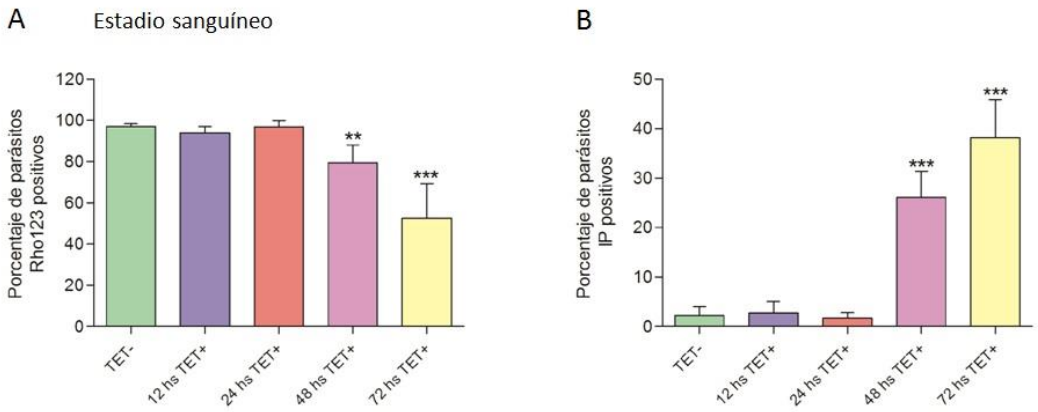

Figura 18. Determinación de la viabilidad de parásitos del clon C5 del estadio sanguíneo por marcación con Rhodamina123 e ioduro de propidio. Ensayo de marcación con Rhodamina123 (Rho123) **(A)** e ioduro de propidio (IP) **(B)** en el estadio sanguíneo a distintos tiempos de inducido el ARNi de *TbRRM1*. Las barras de error indican el desvío estándar con respecto a la media de tres réplicas biológicas independientes, adquiriendo 50.000 eventos para cada tiempo. Test *t* de student **p<0,01; ***p<0,001.

La citometría de flujo es una técnica que permite, además, analizar la morfología de la población. La dispersión de la luz que incide sobre una célula puede estudiarse mediante dos detectores ópticos: uno de ellos mide la dispersión a lo largo de la trayectoria del láser, conocido como dispersión hacia adelante (*forward side,* FSC) y el otro mide la dispersión en un ángulo de 90 grados con respecto al láser, denominado dispersión lateral (*side scatter*, SSC).

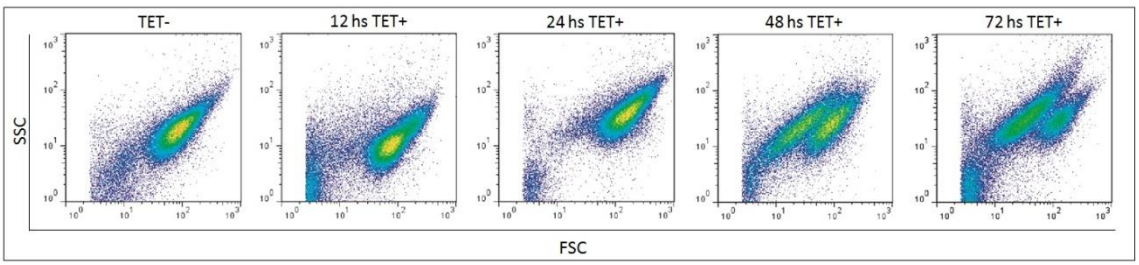

Figura 19. Gráficos *dot plot* de las poblaciones obtenidas luego del silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo. Se grafican el *side scatter* (SSC) *vs forward scatter* (FSC) en las poblaciones del control sin inducir (TET-) y luego de 12, 24, 48 ó 72 horas del agregado de tetraciclina (TET+). Notar la aparición de una población de menor FSC y mayor SSC a partir de las 48 horas de inducción.

Dado que el parámetro FSC es proporcional al diámetro de la célula, es indicativo del tamaño; mientras que el SSC brinda información sobre la complejidad de la muestra [98]. Al analizar estos parámetros se observó la aparición de dos poblaciones distintas a partir de las 48 horas de agregado de TET **(Figura 19)**. Al analizar la marcación con Rho123 y la incorporación de IP en ambas poblaciones se observó que la "población superior" del gráfico FSC *vs* SSC presenta bajo porcentaje de parásitos que incorporan Rho123 (~17%) y alto porcentaje de células IP positivas (~55%) luego de 48 horas del agregado de TET **(Figura 20)**.

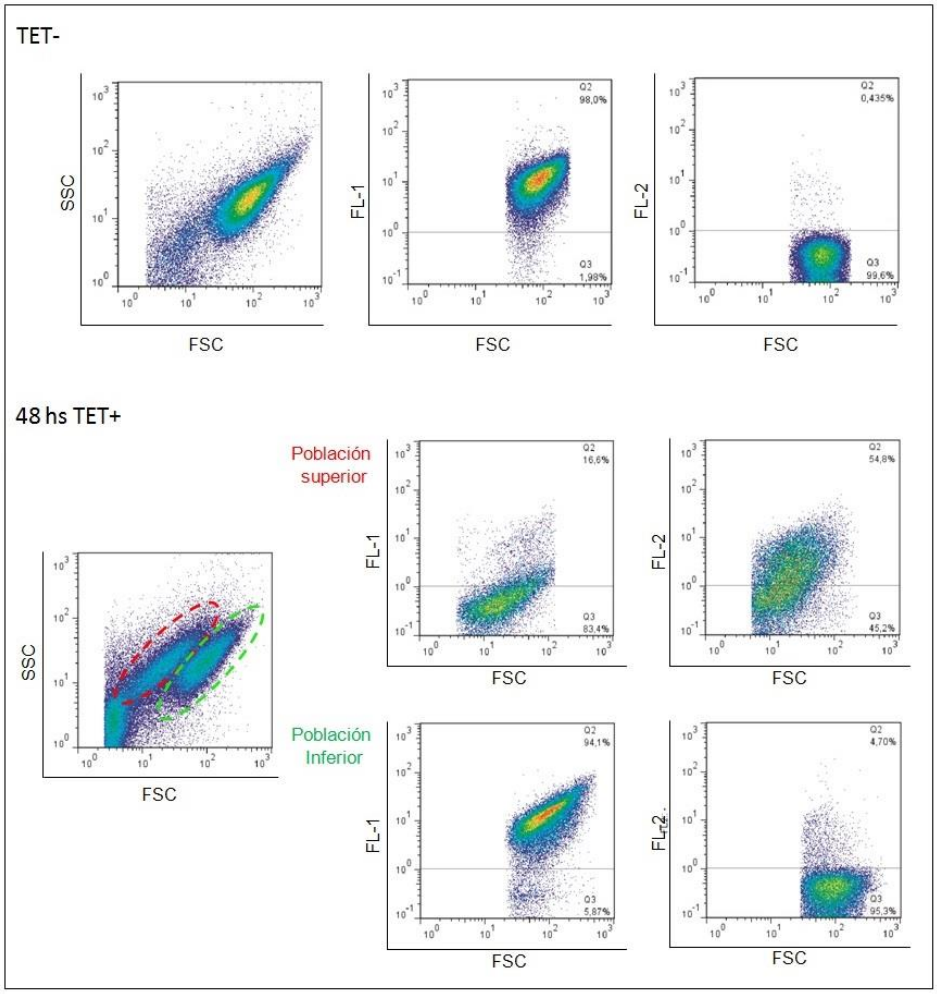

Figura 20. Marcación con Rhodamina123 e incorporación de ioduro de propidio en la población control y luego de 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1 en el clon C5 del estadio sanguíneo. Gráficos *dot plot* mostrando el porcentaje de parásitos Rho123 positivos e IP positivos para el control sin inducir (TET-) o luego de 48 horas del agregado de TET para las poblaciones obtenidas luego del silenciamiento de *TbRRM1*.

Esto indica que el silenciamiento de *TbRRM1* produce la aparición de una población que presenta un tamaño menor (parámetro FSC) y una complejidad mayor (parámetro SSC) a partir de 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1.

A continuación, se estudió la viabilidad de parásitos procíclicos de la línea 5'UTR, que expresan el ARNi de *TbRRM1*. Mediante el análisis por citometría de flujo luego de la marcación con Rho123 e IP en este estadio, se observó una disminución significativa en el porcentaje de parásitos que incorporaron Rho123 y un aumento de la población IP positiva luego de 72 horas post-inducción **(Figura 21)**, mientras que la curva de crecimiento se ve afectada a partir de las 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1 [80].

A diferencia de lo observado en el estadio sanguíneo, en los parásitos procíclicos no se observa la aparición de una nueva población luego de inducida la depleción de TbRRM1.

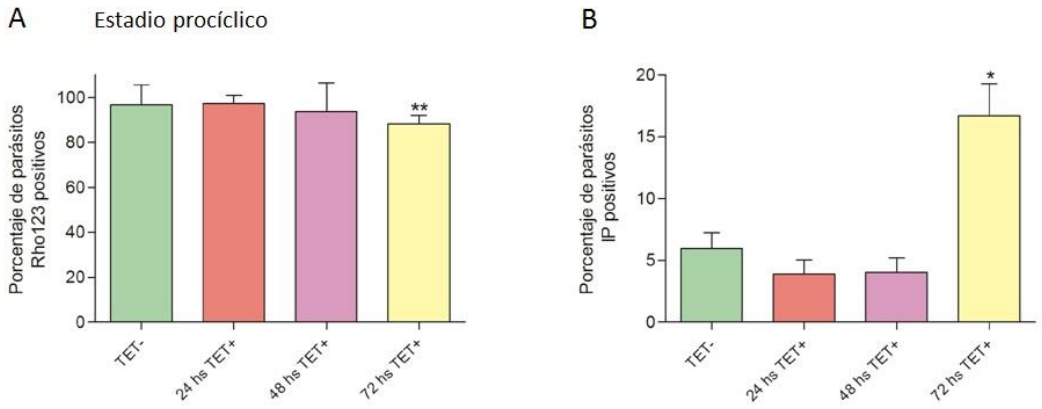

Figura 21. Viabilidad por marcación con Rhodamina123 e ioduro de propidio en parásitos procíclicos de la línea 5'UTR. Ensayo de marcación con Rhodamina123 (Rho123) **(A)** e ioduro de propidio (IP) **(B)** en parásitos de la línea 5'UTR luego de distintos tiempos de inducido el ARNi de *TbRRM1*. Las barras de error indican el desvío estándar con respecto a la media de tres réplicas biológicas independientes, adquiriendo 50.000 eventos para cada tiempo. Test *t* de student *p<0,05; **p<0,01.

Los resultados obtenidos en ambos estadios indican que a pesar de que la curva de crecimiento se ve afectada a partir de las 12 ó 48 horas de inducida la depleción en los estadios sanguíneo y procíclico respectivamente, la muerte de

los parásitos ocurre posteriormente. Este hallazgo demuestra TbRRM1 estaría involucrada directa o indirectamente, en la regulación de la progresión del ciclo celular.

B.4) Análisis de las morfologías observadas al depletar TbRRM1 en el estadio sanguíneo de *T. brucei*.

Dado que TbRRM1 resulta esencial en el estadio sanguíneo, se procedió a analizar mediante microscopía si la morfología de los parásitos se ve afectada luego de su silenciamiento.

En estudios previos de nuestro laboratorio se observó que la depleción de TbRRM1 en el estadio procíclico produce un alargamiento del extremo posterior del parásito, fenotipo denominado "*nozzle*", descripto por primera vez por *E.F. Hendriks y Col.* en 2001 luego de la expresión ectópica de ZFP2, una proteína de unión a ARN implicada en la diferenciación del estadio sanguíneo al procíclico de *T. brucei* [81]. Este fenotipo fue posteriormente reportado para el silenciamiento o la sobreexpresión de varios genes en el estadio procíclico [83; 99; 100; 101] pero no ha sido encontrado en el estadio sanguíneo.

Para evaluar el efecto del silenciamiento de *TbRRM1* en la morfología de los parásitos del estadio sanguíneo, se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti KMP-11 para visualizar el flagelo y cuerpo basal [102]. El análisis de las fotografías demostró que a partir de 12 horas de inducida la depleción de TbRRM1 comienzan a aparecer fenotipos aberrantes, como parásitos con el flagelo desprendido **(Figura 22 A**, segundo a quinto panel**)**. El porcentaje de parásitos con este fenotipo fue de 54 % luego de 12 horas de inducida la depleción de TbRRM1 y de un 40% luego de 24 horas del agregado de TET **(Figura 22 B)**. Si bien el porcentaje de parásitos con flagelo desprendido disminuye llegando al 5,6% luego de 48 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1*, este valor sigue siendo significativo con respecto al control sin inducir. Esta morfología aberrante fué reportada anteriormente luego del silenciamiento de diversas proteínas asociadas a la zona de anclaje al flagelo (FAZ), tanto para el estadio procíclico como en el estadio sanguíneo de *T. brucei* [102-105]. La zona FAZ se asocia al cuerpo basal, el kinetoplasto y el bolsillo flagelar.

Esta región, que además determina el surco de división, es esencial para la correcta citoquinesis, la forma y polaridad celular y el posicionamiento de las organelas [106; 107].

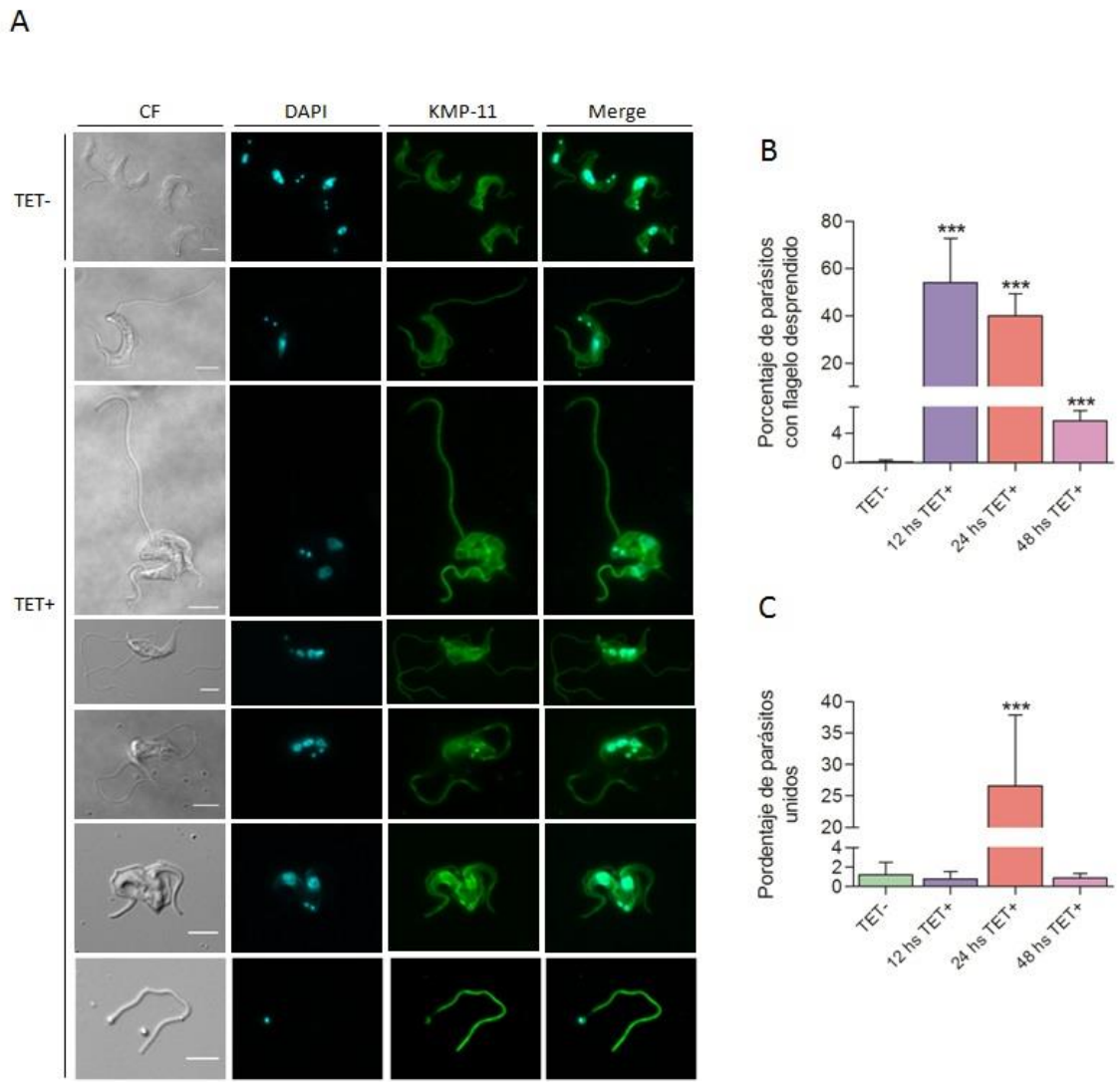

Figura 22. Morfologías observadas luego de la depleción de TbRRM1 en el clon C5 del estadio sanguíneo. (A) IFI en parásitos crecidos en ausencia (TET-) o presencia (TET+) de tetraciclina. Se utilizó el anticuerpo anti KMP-11 para visualizar flagelo y cuerpo basal. Se observa además el contraste de fase (CF) y la marcación con DAPI. (Barra de escala: 10 µm). **(B)** Cuantificación del porcentaje de parásitos con el flagelo desprendido y de parásitos unidos por su extremo posterior **(C)** luego de 12, 24 ó 48 post-inducción. Las barras de error indican el desvío estándar con respecto a la media, contabilizando un total de 900 células en tres o más réplicas biológicas independientes. Test *t* de student ***p<0,001.

Por otra parte, no se observaron diferencias en la configuración de cuerpos basales, indicando que la depleción de TbRRM1 no afectaría la segregación de los mismos.

De manera conjunta en la misma inmunofluorescencia, se realizó la marcación con DAPI para visualizar núcleos y kinetoplastos. Se observaron parásitos con distribución núcleo/kinetoplasto aberrante, multinucleados y anucleados (0N1K) luego del agregado de TET **(Figura 22 A**; cuarto, quinto y séptimo panel**)**. Los parásitos con configuración 0N1K denotan defectos en la división celular y fueron denominados anteriormente como "*zooides*" por *D.R. Robinson y Col*. en 1995, donde se demostró que estos parásitos que carecen de núcleo poseen el flagelo "nuevo" asociado al complejo kinetoplasto/cuerpo basal [107]

Además de las morfologías aberrantes como parásitos multinucleados y con flagelo desprendido del cuerpo celular, se observó un aumento inusual en el porcentaje de parásitos que permanecieron conectados por su extremo posterior luego de 24 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1*. Esta alteración puede deberse a que la motilidad flagelar es necesaria para la citoquinesis, por lo tanto la progresión del surco de división se ve afectada llevando a la acumulación de células conectadas por su extremo posterior, en proceso de división incompleto [108; 109] **(Figura 22 A** sexto panel, y **C)**.

B.5) Análisis de la configuración de núcleos y kinetoplastos luego de la depleción de TbRRM1 en los estadios procíclico y sanguíneo de *T. brucei*.

Teniendo en cuenta que el crecimiento de los parásitos se ve afectado luego de 12 ó 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1 en los estadios sanguíneo y procíclico, respectivamente, y que este efecto no se debe a la pérdida de viabilidad, se procedió a estudiar el ciclo celular mediante la cuantificación de la configuración de núcleos (N) y kinetoplastos (K) luego del silenciamiento de *TbRRM1*.

Dado que la segregación del kinetoplasto precede a la división nuclear [110; 111], parásitos con configuración 1N1K están en fase G1 del ciclo celular, mientras que los que tienen configuración 1N2K están en fase G2 y los que presentan 2N2K están en mitosis. De manera similar, la morfología del kinetoplasto también contribuye a evaluar la distribución del ciclo celular ya que

los parásitos en fase S muestran un kinetoplasto alargado (1N1K*) [112] **(Figura 23)**.

Por otra parte, la localización de núcleos y kinetoplastos en *T. brucei* ocurre de una manera determinada. Si bien en ambos estadios el kinetoplasto se encuentra en la región posterior del parásito, existen algunas diferencias. Por ejemplo, luego de la mitosis en parásitos procíclicos los núcleos se localizan a cada lado de los kinetoplastos, de manera intercalada (N-K-N-K). Mientras que en el estadio sanguíneo los núcleos se localizan juntos, en la región anterior del parásito y los kinetoplastos ocupan la región posterior (N-N-K-K) **(Figura 23**, M**)** [113].

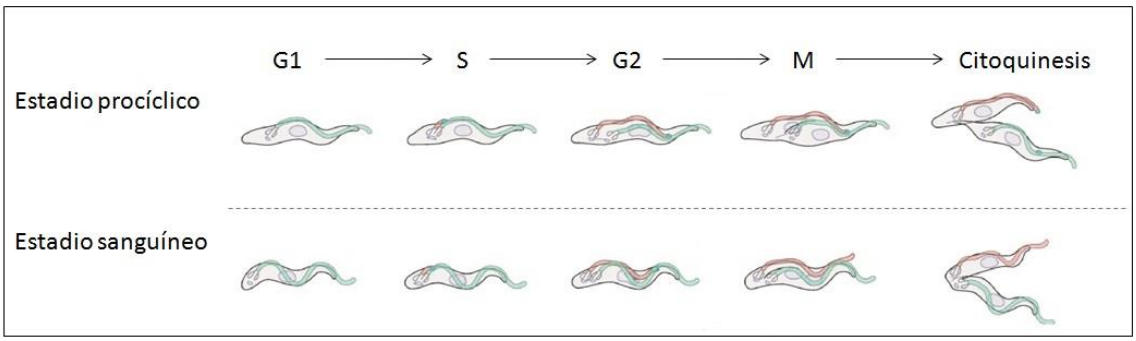

Figura 23. **Esquema de la configuración de núcleos y kinetoplastos durante el ciclo celular.** Se representa la relación entre núcleos (N) y kinetoplastos (K) y la fases del ciclo celular para los estadios procíclico y sanguíneo de *T. brucei*. Modificado de *R.H. Wheeler y Col.,* 2013 [109].

Para analizar las configuraciones N/K, se realizó la marcación con DAPI junto con un análisis microscópico exhaustivo para determinar la distribución del ciclo celular en cultivos control (TET-) y a distintos tiempos luego del agregado de tetraciclina (TET+).

Para el estadio sanguíneo se contabilizaron en total más de 900 células en, al menos, tres réplicas biológicas independientes. Los resultados para este estadio mostraron un incremento del 8,9 % en la población de parásitos con configuración 1N1K a partir de 12 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1* **(Figura 24 A)**. Además, se observó una disminución en el porcentaje de las poblaciones 1N1K* (de 20,7 % a 17 %) y 2N2K (de 12,2 % a 5,8 %), que

podría correlacionarse con el incremento de la proporción de parásitos 1N1K que no continúan con el proceso de división.

Luego de 24 horas de inducida la depleción de TbRRM1 no se observaron diferencias en el porcentaje de parásitos con configuraciones 1N1K y 2N2K con respecto al control sin inducir, sin embargo se produce un incremento en la proporción de parásitos aberrantes **(Figura 24 A,** otros**)**. Esta población, que incluye células multinucleadas y parásitos con núcleos y kinetoplastos mal localizados, llega a casi un 8 % luego de 24 horas del agregado de TET alcanzando un 13,8 % luego de 48 horas post-inducción. Al analizar la configuración de estos parásitos con núcleos y kinetoplastos mal localizados, se observó que esta población corresponde a células en fase G2/M del ciclo celular **(Figura 24 C)**.

Por otro lado, el porcentaje de células 1N1K*, correspondiente a la fase S del ciclo celular, continuó disminuyendo hasta llegar a un 10,5% luego de 48 horas de inducido el ARNi de *TbRRM1* **(Figura 24 A)**. También se observó un incremento en el porcentaje de parásitos zooides, alcanzando más de un 3% de la población total luego de 48 horas del agregado de TET **(Figura 24 A**, zooides**)**.

La acumulación de células con configuración 1N1K y la aparición de poblaciones aberrantes indicarían que TbRRM1 es esencial para la progresión normal del ciclo celular.

A continuación se analizó la configuración N/K en parásitos procíclicos de la línea 5'UTR, contabilizando más de 800 células en tres réplicas biológicas independientes. Los resultados demostraron que luego de 24 horas post-inducción, comienzan a aparecer parásitos zooides. Esta población aumenta significativamente con el tiempo de agregado de TET, llegando a un 35,2% luego de 72 horas de inducida la depleción de TbRRM1 **(Figura 24 B,** zooides**)**. También se observó que luego de 48 horas de agregado de TET, ocurre una disminución significativa de parásitos con configuración 1NK* (fase S nuclear) y 2N2K (mitosis).

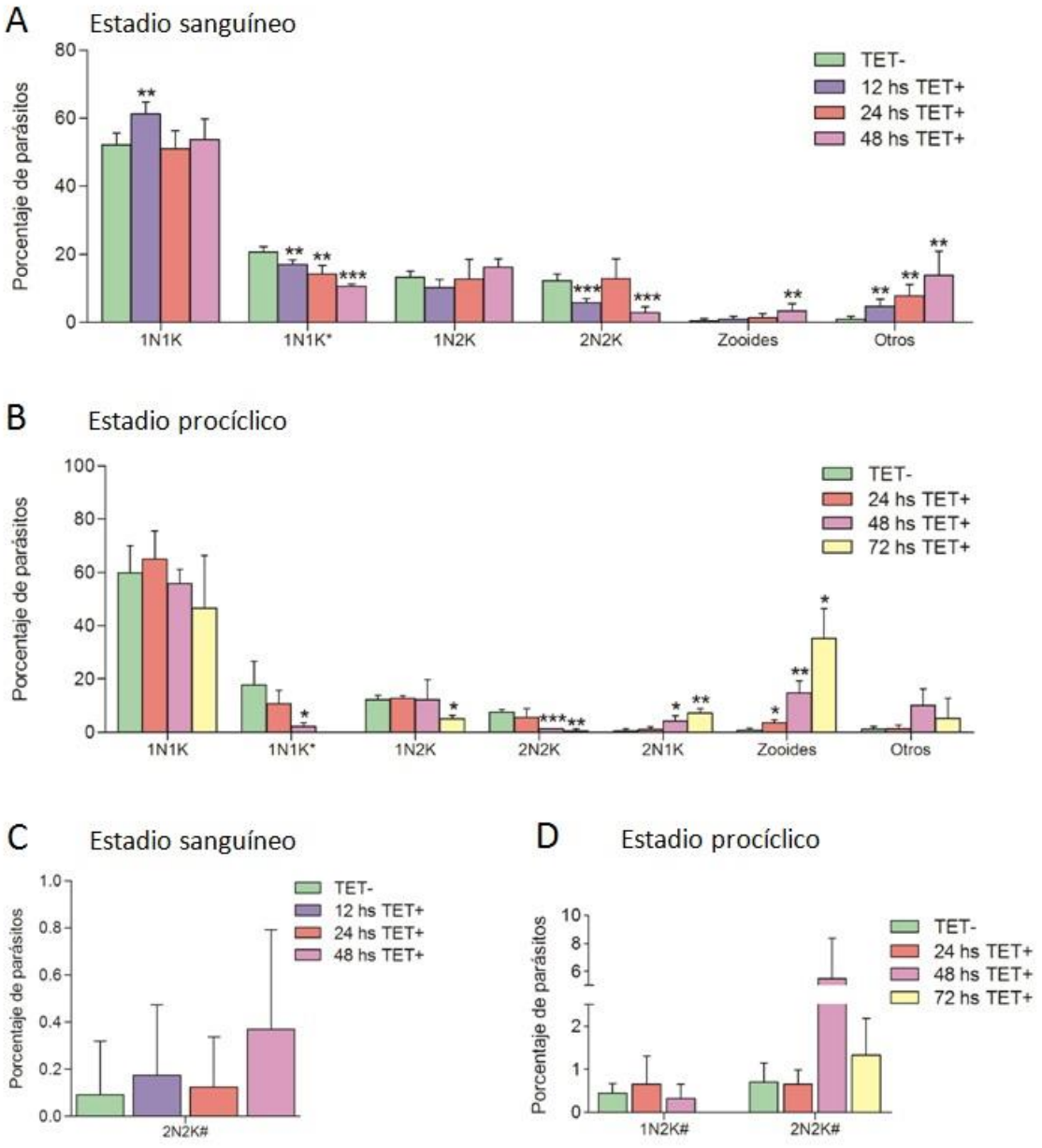

Figura 24. Configuración núcleo/kinetoplasto luego del silenciamiento de *TbRRM1* en los estadios sanguíneo y procíclico de *T. brucei*. Ensayo de cuantificación de la configuración de núcleos (N) y kinetoplastos (K) mediante tinción con DAPI y microscopía a diferentes tiempos luego de la inducción del ARNi de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo **(A)** y procíclico **(B)**. Las barras de error indican el desvío estándar con respecto a la media de, al menos, tres réplicas biológicas independientes contabilizando más de 900 células para el estadio sanguíneo y más de 800 para el estadio procíclico. Se representan además las configuraciones de las poblaciones de parásitos con N y K mal localizados (#) para el estadios sanguíneo **(C)** y procíclico **(D)**. Test *t* de student * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Al analizar las poblaciones con configuraciones aberrantes o con núcleos y kinetoplastos mal localizados con respecto a la distribución normal **(Figura 24 B**, otros**)**, se observó que en el caso de parásitos del estadio procíclico, corresponden a la fase S del ciclo celular (1N2K) y mitosis (2N2K) **(Figura 24 D)**. Además, a partir de las 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1 se incrementa significativamente el porcentaje de parásitos con una configuración aberrante 2N1K, lo que indica una incorrecta segregación del núcleo durante la división **(Figura 24 B**, 2N1K**)**.

Los resultados de la cuantificación de las configuraciones de núcleos y kinetoplastos sugieren que TbRRM1 estaría involucrada en la regulación del ciclo celular ya que luego de su depleción se observaron configuraciones NK y morfologías aberrantes en ambos estadios de *T. brucei*.

B.6) Análisis del ciclo celular por citometría de flujo luego de la depleción de TbRRM1 en los estadios procíclico y sanguíneo de *T. brucei*.

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en la cuantificación de las configuraciones de núcleos y kinetoplastos, se analizó el ciclo celular por marcación con ioduro de propidio (IP) en ambos estadios. El contenido de ADN fue analizado por citometría de flujo utilizando el programa FlowJo 7.6.

Al evaluar el ciclo celular por marcación con IP y citometría de flujo en el estadio sanguíneos se observó un incremento en el porcentaje de células hipodiploides, con contenido de ADN menor al correspondiente a la fase G1, denominado contenido hipodiploide (o Sub-G1) a partir de las 12 horas del agregado de TET. A las 48 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1*, este efecto se incrementó notablemente alcanzando el 49,3% de la población total **(Figura 25 A** y **B**, Sub-G1**)**. Además, luego de 12 horas post-inducción, la proporción de células con un contenido de ADN mayor a la fase G2 (Supra-G2) aumenta, probablemente debido a la aparición de parásitos multinucleados, este fenotipo ya fue visto al estudiar la morfología celular luego de la depleción de TbRRM1 (**Figuras 22**, cuarto y quinto panel**)**.

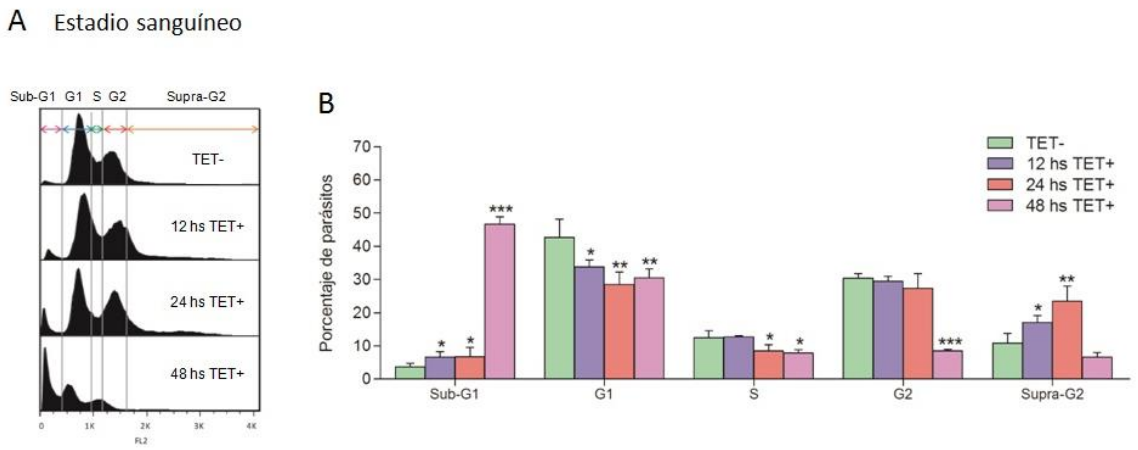

Figura 25. Ciclo celular por marcación con ioduro de propidio en el clon C5 del estadio sanguíneo de *T. brucei*. (A) Histogramas representativos de tres réplicas biológicas independientes en parásitos sanguíneos sin inducir o a distintos tiempos de inducción con TET. **(B)** Cuantificación de la distribución del ciclo celular evaluada por citometría de flujo. Se muestran los valores de la media de tres réplicas biológicas independientes junto con los desvíos estándar, adquiriendo 50.000 eventos para cada tiempo. Test *t* de student * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Por otra parte, el análisis de ciclo celular por citometría de flujo no permitió corroborar el arresto en G1 observado como una acumulación de parásitos con configuración 1N1K en el ensayo de cuantificación de núcleos y kinetoplastos **(Figura 24 A)**, ya que no se observó un incremento en la proporción de células con un contenido de ADN correspondiente a la fase G1 del ciclo celular luego de 12 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1* **(Figuras 25 A** y **B**, G1**).**
A continuación, se estudió el ciclo celular por citometría de flujo en parásitos procíclicos de la línea 5'UTR. Se observó en este estadio un incremento en el porcentaje de parásitos en fase G1 del ciclo celular de aproximadamente un 9% luego de 24 horas del agregado de TET. Además, se evidenció una disminución en las poblaciones en fase S y G2 del ciclo celular (de 11,82% a 8,98% y de 32,98% a 25,45%, respectivamente) **(Figura 26 B)**. Luego de 48 horas de inducido el ARNi de *TbRRM1* se incrementó significativamente el porcentaje de parásitos en fase Sub-G1 del ciclo celular, alcanzando un 53,8% luego de 72 horas del agregado de TET. Esta población hipodiploide, puede corresponder a los parásitos zooides o bien, puede deberse a la fragmentación del ADN por muerte celular [114].

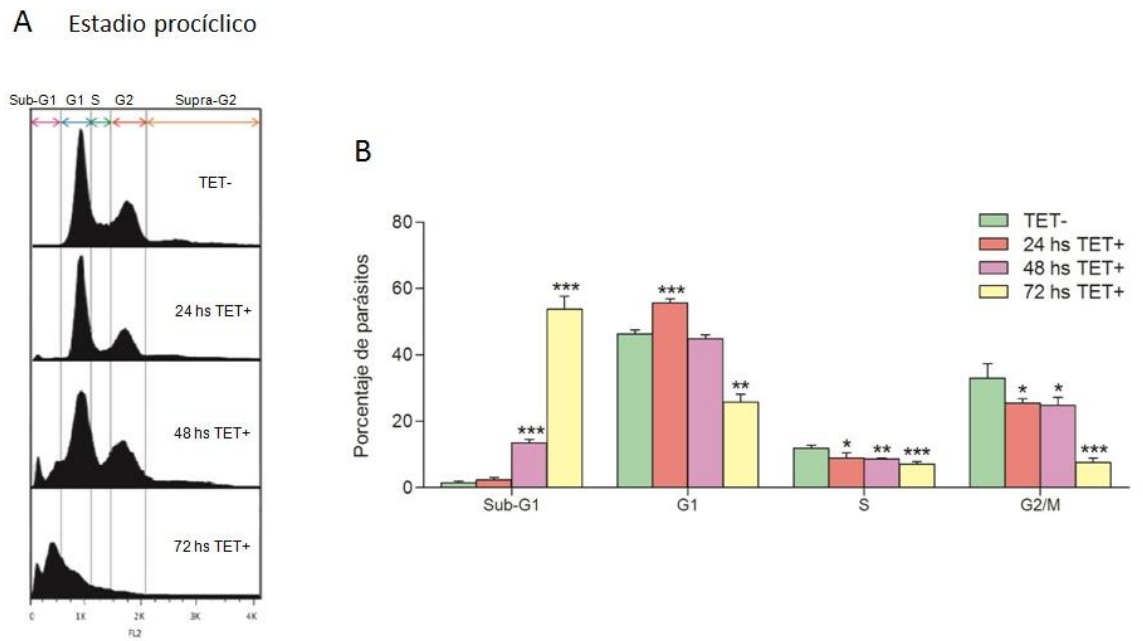

Figura 26. Ciclo celular por marcación con ioduro de propidio en parásitos procíclicos de la línea 5'UTR de *T. brucei*. (A) Histogramas representativos de tres réplicas biológicas independientes en parásitos procíclicos sin inducir o a distintos tiempos del agregado de TET. **(B)** Cuantificación de la distribución del ciclo celular evaluada por citometría de flujo. Se muestran los valores de la media de tres réplicas biológicas independientes junto con los desvíos estándar, adquiriendo 50.000 eventos para cada tiempo. Test *t* de student *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Si bien el análisis del ciclo celular no permitió corroborar totalmente los resultados obtenidos por cuantificación de la configuración de núcleos y kinetoplastos en parásitos sanguíneos, se observó que TbRRM1 es necesaria para la progresión normal del ciclo celular en ambos estadios de *T. brucei*.

B.7) Estudio del potencial de membrana mitocondrial luego del silenciamiento de *TbRRM1* en los estadios procíclico y sanguíneo de *T. brucei*.

Anteriormente, mediante el ensayo de marcación con Rhodamina123 e ioduro de propidio se observó que el porcentaje de parásitos viables disminuye luego de 48 ó 72 horas de inducción del ARNi de *TbRRM1* en los estadios sanguíneo y procíclico, respectivamente **(Figura 18** y **Figura 21)**. Dado que Rho123 se distribuye en la membrana interna mitocondrial de acuerdo al potencial de

membrana (Ψ), este parámetro (que se ve afectado durante la apoptosis) dá como resultado la disminución en la intensidad de fluorescencia que puede determinarse mediante citometría de flujo [115; 116]. Como se muestra en la **Figura 27**, para el estadio sanguíneo la población de parásitos con Ψ disminuido aumentó significativamente luego del silenciamiento de *TbRRM1*, alcanzando un 54 % y un 69 % luego de 48 y 72 horas de inducción, respectivamente.

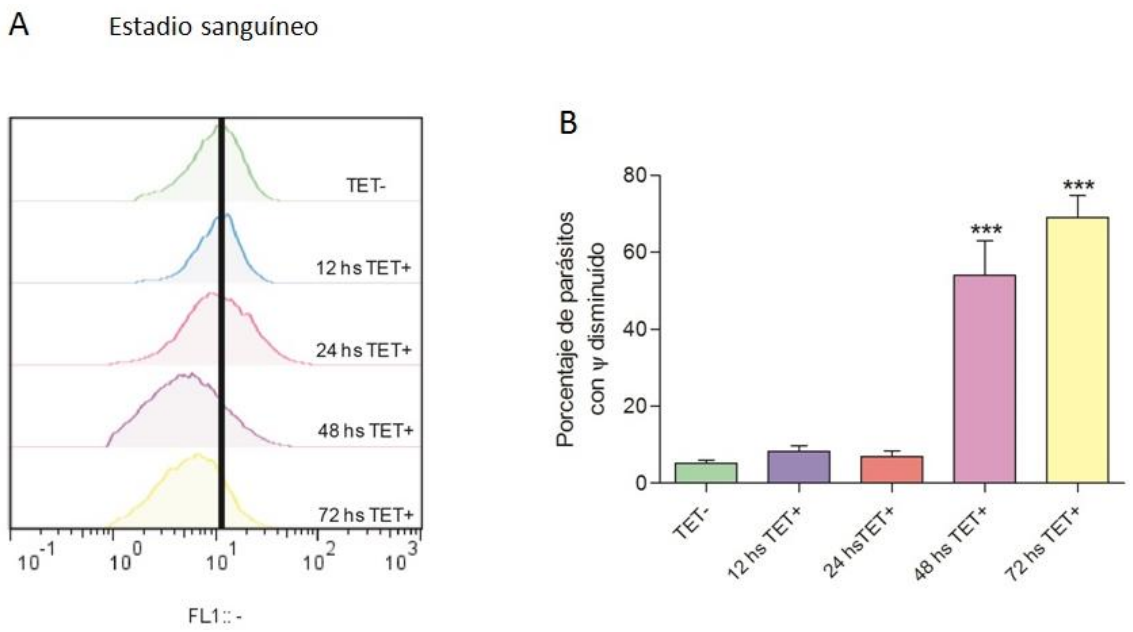

Figura 27. Pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Ψ) luego del silenciamiento de TbRRM1 en el clon C5 del estadio sanguíneo. (A) Histogramas de intensidad de fluorescencia media relativa de FL-1 (Rho123) a distintos tiempos de inducción. **(B)** Proporción de parásitos Rho123 positivos con Ψ disminuído. Las barras de error representan el desvío estándar con respecto al valor medio de tres réplicas biológicas independientes, adquiriendo 50.000 eventos para cada tiempo. Test *t* de Student *** $p<0.001$.

Para el estadio procíclico, la población con Ψ disminuído se incrementa a partir de 24 horas post-inducción **(Figura 28)**. Esto último coincide con los ensayos realizados previamente de marcación con Anexina V-FITC (AN) e ioduro de propidio (IP), donde se observó que luego de 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1 hay un incremento de parásitos AN positivos [80].

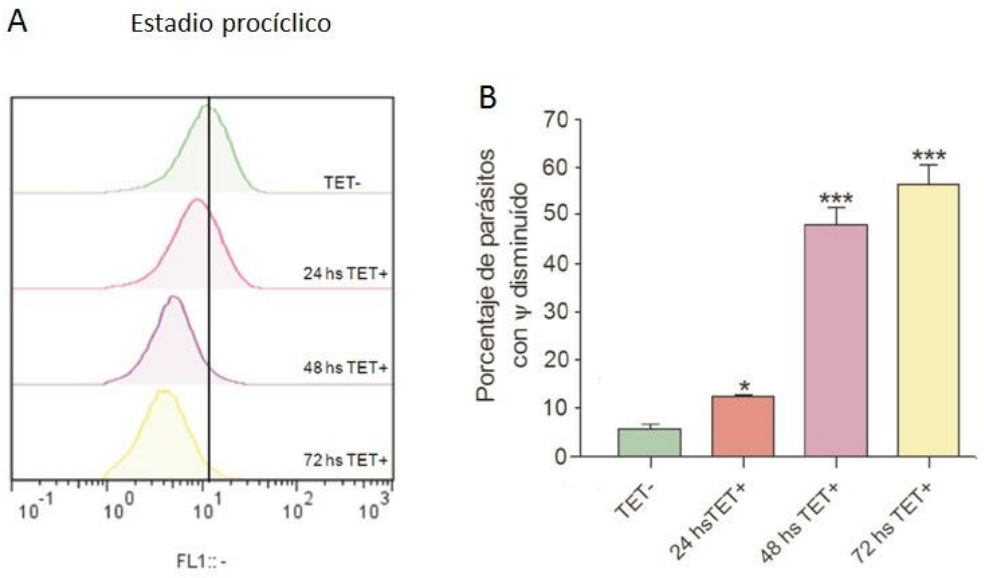

Figura 28. Pérdida de potencial de membrana mitocodrial (Ψ) en parásitos procíclicos de la línea 5'UTR luego de la depleción de *TbRRM1.* (A) Histogramas de intensidad de fluorescencia media relativa de FL-1 (Rho123) a distintos tiempos de inducción. **(B)** Proporción de parásitos Rho123 positivos con potencial de membrana mitocondrial (Ψ) disminuído. Las barras de error representan el desvío estándar con respecto al valor medio de tres réplicas biológicas independientes, adquiriendo 50.000 eventos para cada tiempo. Test *t* de Student *p<0,05; ***p<0.001.

Los resultados obtenidos para ambos estadios de *T. brucei* demuestran que el potencial de membrana mitocondrial se ve afectado luego de inducido el silenciamiento de *TbRRM1*, lo que sugiere que la muerte celular de los parásitos podría deberse a un mecanismo apoptótico.

B.8) Marcación con Anexina V-FITC e ioduro de propidio en el estadio sanguíneo de *T. brucei* luego del silenciamiento de *TbRRM1*.

Dado que luego de 24 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1* en el estadio sanguíneo se produce un incremento en la cantidad de parásitos con potencial de membrana mitocondrial disminuído **(Figura 27)**, se decidió realizar una marcación conjunta con Anexina V-FITC (AN) e ioduro de propidio (IP) para corroborar si la muerte celular de los parásitos se produce por un mecanismo apoptótico.

Cultivos control sin inducir (TET-) y cultivos a distintos tiempos de inducción con tetraciclina (TET+) fueron marcados con AN e IP y analizados por citometría de flujo. Los resultados demostraron que luego de 48 horas de

inducida la depleción de TbRRM1, tanto la población AN+ / IP- (apoptosis temprana) como la población de células AN+ / IP+ (apoptosis tardía) aumentaron significativamente **(Figura 29 B)**.

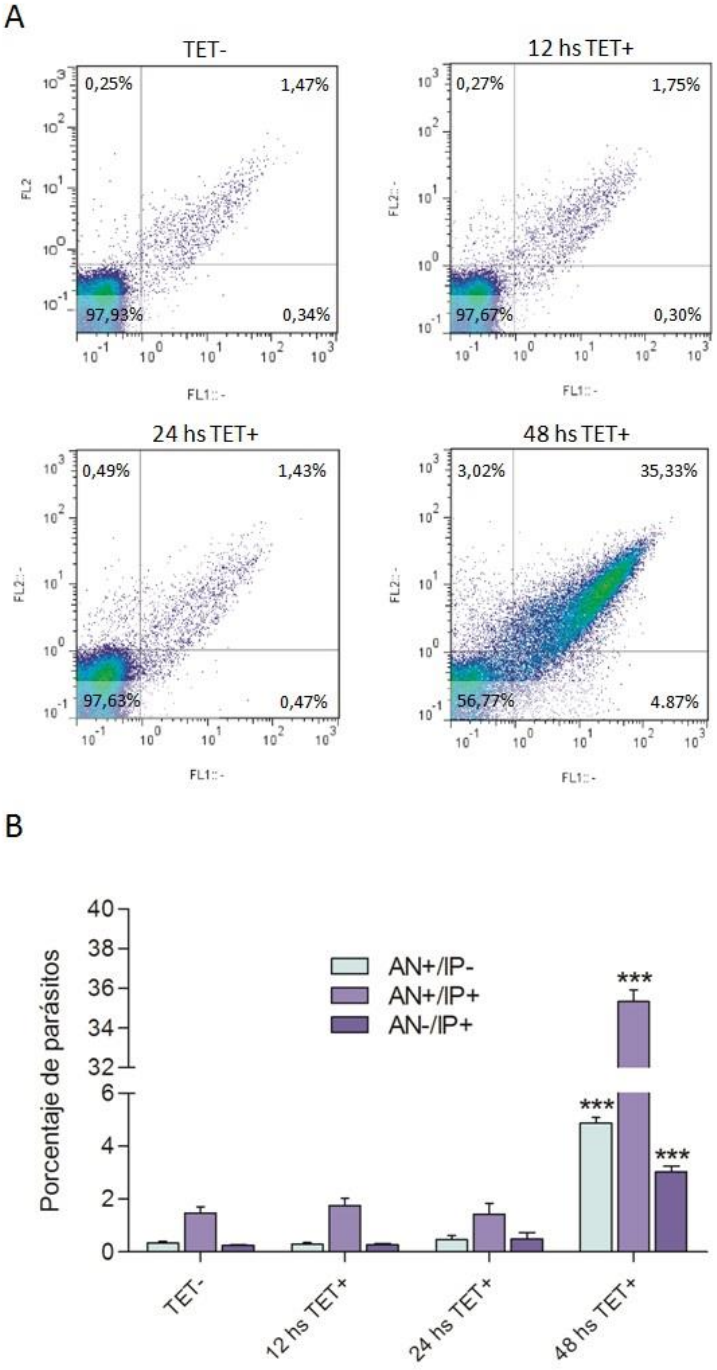

Figura 29. Ensayo marcación con Anexina V-FITC e ioduro de propidio en parásitos del clon C5 luego del silenciamiento de TbRRM1 en el estadio sanguíneo. (A) Gráfica *dot plot* de la marcación conjunta de parásitos con Anexina V-FITC (AN) e Ioduro de Propidio (IP) a distintos tiempos luego del silenciamiento de *TbRRM1*. **(B)** Cuantificación del porcentaje parásitos positivos para AN e IP. Las barras de error representan el desvío estándar con respecto al valor medio de tres réplicas biológicas independientes, adquiriendo 50.000 eventos para cada tiempo. Test *t* de Student *** p <0,001.

Estos resultados junto con la aparición de una población hipodiploide observada por citometría de flujo por marcación con IP **(Figura 25,** Sub-G1**)** y la evaluación del potencial de membrana, sugieren que la depleción de TbRRM1 conduce a la muerte celular por un mecanismo apoptótico a partir de las 48 horas del agregado de TET en el estadio sanguíneo de *T. brucei*.

C) Complementación de TbRRM1 en el estadio procíclico de *T. brucei*

Una vez estudiado el efecto de la depleción de TbRRM1 en ambos estadios de *T. brucei*, se estableció un sistema para complementar su silenciamiento en el estadio procíclico. Para ello, se realizó una construcción en el vector pLEW100v5 (Lab. Dr. George Cross, no publicado. Modificado por el Dr. León Bouvier) para sobreexpresar, de manera inducible con tetraciclina (TET), TbRRM1 etiquetada con el péptido 3xFLAG en su extremo amino-terminal **(Figura 30)**.

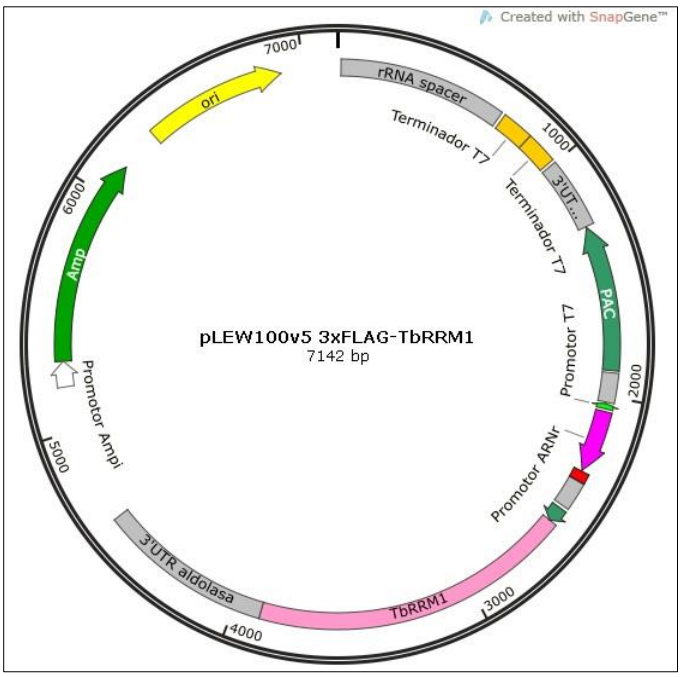

Figura 30. Construcción para la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*. El vector pLEW100v5 tiene un promotor ribosomal inducible por tetraciclina, resistencia a puromicina (PAC) y se integra en la región ribosomal del genoma del parásito. La proteína TbRRM1 etiquetada con 3xFLAG en su extremo amino terminal se clonó entre los sitios HindIII y BamHI.

Se transfectaron con esta construcción parásitos procíclicos de la línea 5'UTR, que expresan el ARNi de *TbRRM1*. Luego se realizó un clonado por dilución límite de la población seleccionada obteniéndose varios clones. Se continuó trabajando con uno de ellos, denominado A12.

C.1) Titulación de tetraciclina en parásitos de la línea 5'UTR depletada de TbRRM1.

Dado que en el clon A12 tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de *TbRRM1* están bajo el mismo sistema inducible, al agregar TET ocurrirá de manera simultánea la expresión del ARNi y la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*. Por ello, se realizó en primer lugar la titulación de TET en la línea 5'UTR con el objetivo de determinar la concentración del inductor necesaria para inducir el ARNi de *TbRRM1*. Las concentraciones de TET ensayadas fueron 5, 10, 50, 75, 100 y 1000 ng/ml durante 24 ó 48 horas de inducción.

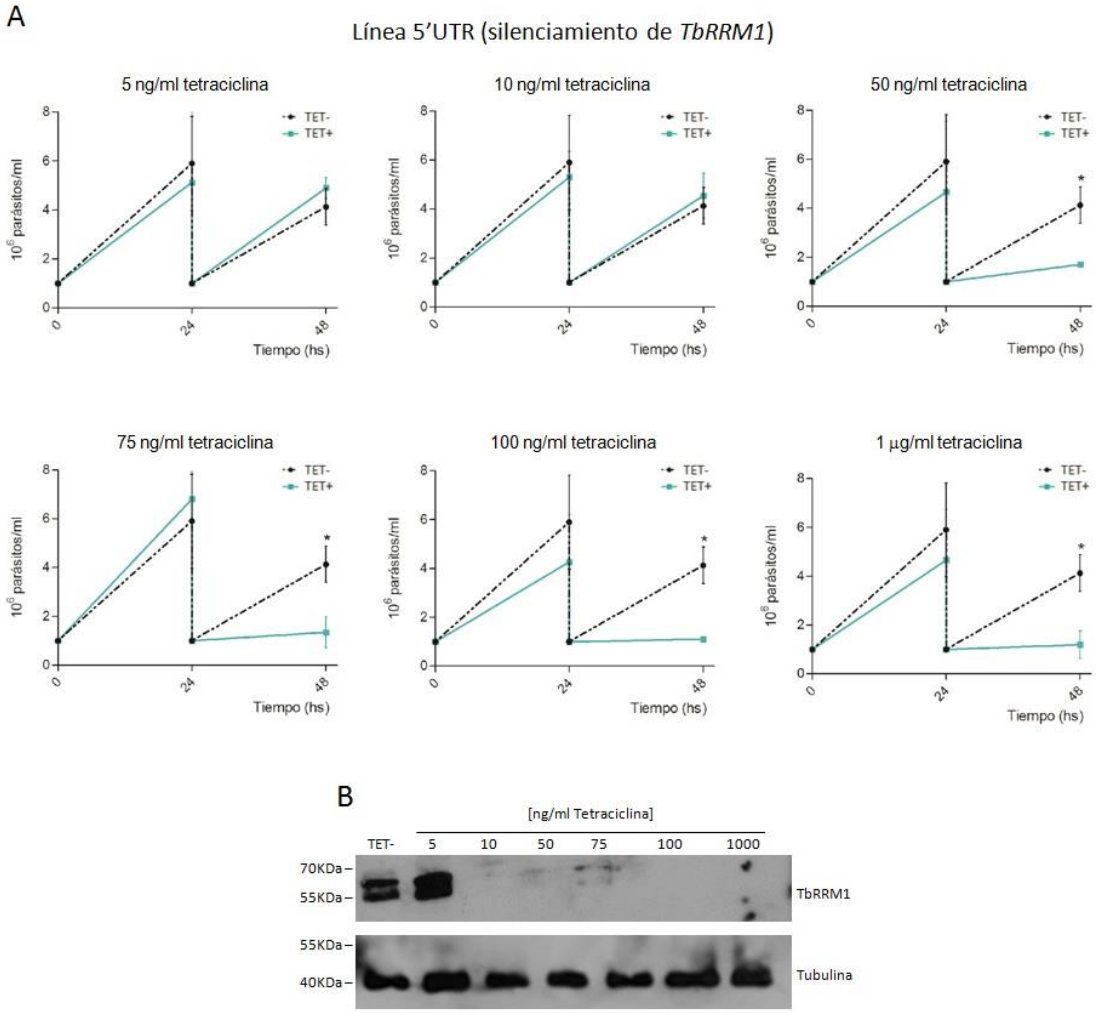

Figura 31. Inducción del ARNi de *TbRRM1* en la línea 5'UTR. (A) Curvas de crecimiento de parásitos procíclicos de la cepa 5'UTR para el control (TET-) y luego de 24 ó 48 horas del agregado de tetraciclina (TET+). Se presentan tres réplicas biológicas independientes y sus desvíos estándar. **(B)** Western blot a distintas concentraciones de TET a 24 horas de inducción. Test *t* de Student en comparación con las muestras TET-. * p <0,05.

Al analizar la curva de crecimiento se observó que comienza a verse afectada a partir de 50 ng/ml de TET luego de 48 horas post-inducción **(Figura 31 A)**. Los niveles de TbRRM1 se evaluaron mediante western blot y se observó que, a partir del agregado de 10 ng/ml de TET, TbRRM1 deja de detectarse luego de 24 horas de inducida su depleción **(Figura 31 B)**.

C.2) Ensayo de complementación de TbRRM1 por sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en el clon A12.

A continuación y una vez puesta a punto la concentración del inductor para silenciar *TbRRM1*, se realizó la curva de crecimiento a distintas concentraciones de TET para el clon A12, que expresa de manera conjunta el ARNi y la proteína ectópica 3xFLAG-TbRRM1. El objetivo de este ensayo fue determinar si la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* complementa el efecto del silenciamiento de *TbRRM1* en el crecimiento de los parásitos.

Al realizar este ensayo se observó que la curva de crecimiento se vió afectada con 1000 ng/ml de TET luego de 48 horas del agregado del inductor **(Figura 32 A)**. Mediante western blot se observó que 3xFLAG-TbRRM1 comienza a expresarse a partir de 10 ng/ml de TET a partir de 24 horas post-inducción **(Figura 32 B)**.

En parásitos de la línea 5'UTR depletados de TbRRM1 la curva de crecimiento comienza a afectarse a partir de los 50 ng/ml de TET a 48 horas de inducción **(Figura 31 A)**, mientras que en el clon A12 (que expresa tanto el ARNi como la proteína ectópica) el crecimiento se ve afectado al inducir con 1000 ng/ml de TET a las 48 horas post-inducción. Este resultado indica que, entre 50 ng/ml y 100 ng/ml de TET, el crecimiento de los parásitos se complementa con la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*.

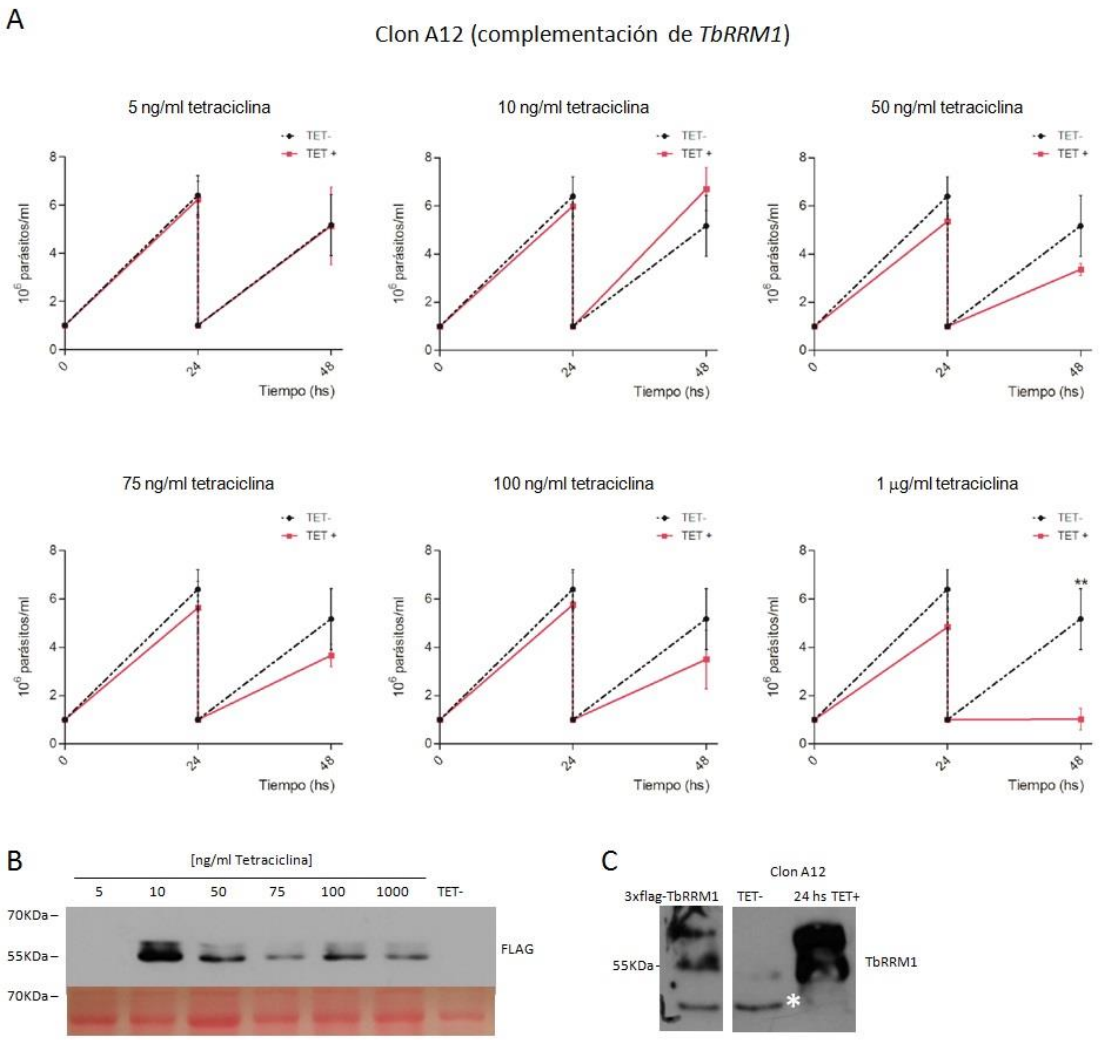

Figura 32. Inducción de la sobreexpresión ectópica y del silenciamiento endógeno de *TbRRM1* en el clon A12. (A) Curva de crecimiento de parásitos procíclicos del clon A12 a 24 ó 48 horas de inducción (TET+) o en el control sin inductor (TET-). Se presentan tres réplicas biológicas independientes y sus desvíos estándar. **(B)** Western blot a distintas concentraciones de TET a 24 horas de inducción. **(C)** Western blot mostrando el silenciamiento de la porteína endógena TbRRM1. Test *t* de Student en comparación con las muestras TET-. ** p<0,01.

D) Estudio del efecto de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en parásitos procíclicos del clon G11.A.

Dado que TbRRM1 es esencial para ambos estadios de *T. brucei*, se continuó con la caracterización estudiando los efectos de su sobreexpresión en el estadio procíclico.

Para ello, parásitos de la línea 29.13 (que expresan la polimerasa T7 y el represor de TET) fueron transfectados con una construcción para la sobreexpresión de manera inducible de *3xFLAG-TbRRM1*, la misma que la utilizada para los ensayos de complementación **(Figura 30)**. Luego de la transfección, se realizó un clonado por dilución límite de la población seleccionada obteniéndose varios clones. Se continuó trabajando con uno de ellos, denominado G11.A.

Se realizó la titulación de TET en este clon utilizando 5, 10, 50, 75, 100 y 1000 ng/ml del inductor durante 24 ó 48 horas.

La curva de crecimiento de los parásitos se vió afectada con 1 µg/ml de TET luego de 48 horas de inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*, indicando que el exceso de proteína es deletéreo para la sobrevida del parásito **(Figura 33 A)**. Como control, se realizó la curva de crecimiento en parásitos de la línea 29.13 de *T. brucei,* demostrando que en esta línea sin la construcción el efecto deletéreo en la curva de crecimiento no se debe al agregado de TET **(Figura 33 B)**. La expresión de la proteína ectópica se evaluó mediante western blot y se observó expresión del 3xFLAG a partir de 75 ng/ml de TET a partir de las 24 horas post-inducción **(Figura 33 C)**.

Los resultados obtenidos muestran que tanto el silenciamiento [80] como la sobreexpresión de *TbRRM1* afectan la sobrevida del parásito. Este hallazgo resulta interesante ya que existen pocos casos reportados en los que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de una proteína resulta deletérea.

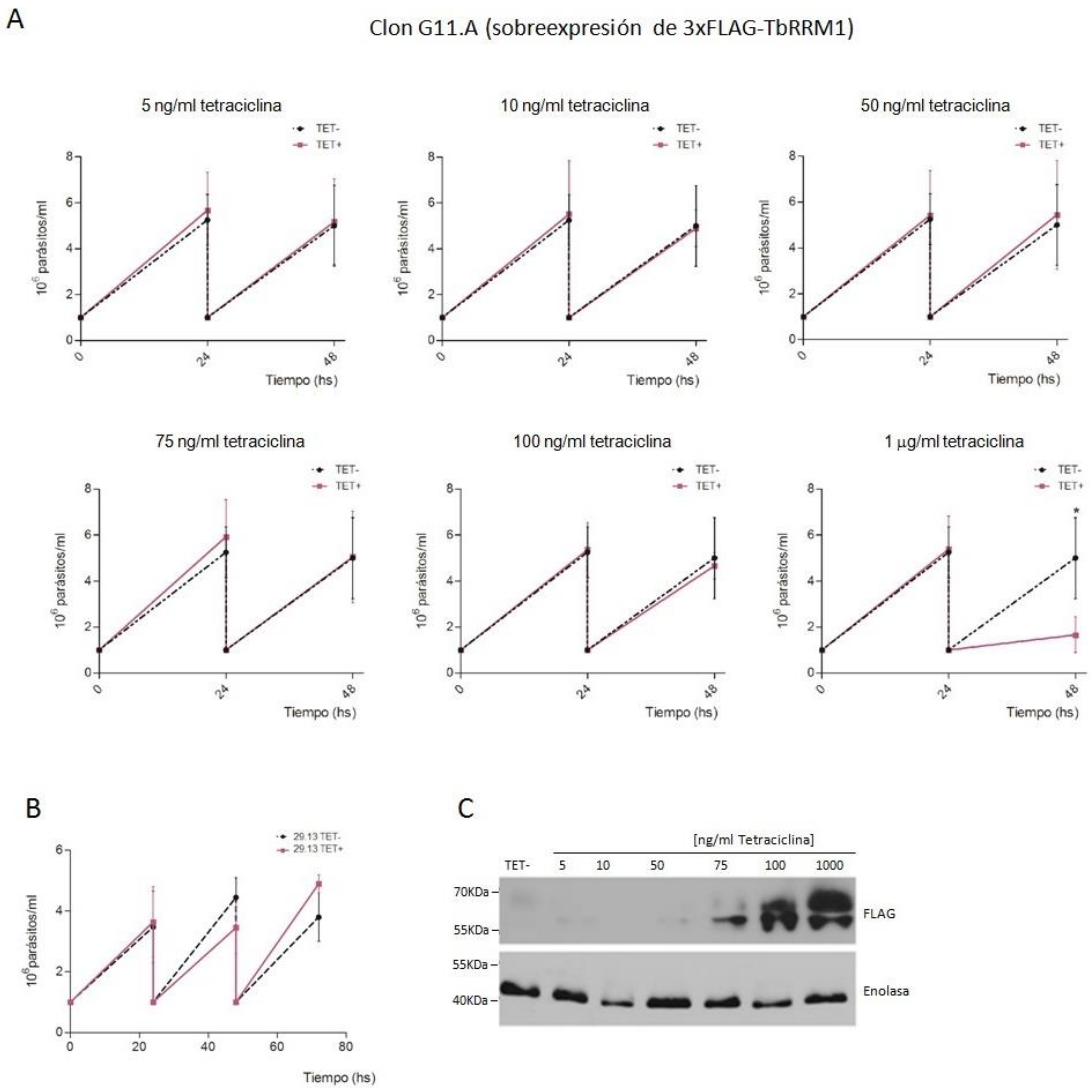

Figura 33. Inducción de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en el clon G11.A a distintas concentraciones de tetraciclina. (A) Curvas de crecimiento del clon G11.A de parásitos procíclicos de la cepa 29.13 que sobreexpresan *3xFLAG-TbRRM1* a 24 ó 48 horas de inducción (TET+) o en el control sin inductor (TET-). Se presentan curvas de crecimiento de tres réplicas biológicas independientes con sus desvíos estándar. **(B)** Curva de crecimiento de parásitos de la línea 29.13 a distintos tiempos de inducción con 1 µg/ml de TET. **(C)** Western blot a distintas concentraciones de TET a 24 horas de inducción. Test *t* de Student en comparación con las muestras TET-. *p<0,05

D.1) Localización subcelular de la proteína 3xFLAG-TbRRM1 en el clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*)

Dado que la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* resulta deletérea para el crecimiento de los parásitos, se comenzó a caracterizar el efecto de la sobreexpresión de la proteína ectópica estudiando su localización subcelular. Para ello, se realizaron inducciones a 24 ó 48 horas con dos concentraciones de tetraciclina: 75 ng/ml y 1 µg/ml. La inducción con 75 ng/ml de TET no afecta la curva de crecimiento de los parásitos mientras que con 1 µg/ml luego de 48 horas la curva de crecimiento comienza a verse afectada **(Figura 33 A)**. La localización subcelular de 3xFLAG-TbRRM1 se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario anti-FLAG.

Los resultados demostraron que al inducir con una concentración baja de tetraciclina (75 ng/ml), la proteína ectópica conserva la misma localización que la proteína endógena, mientras que al inducir con 1 µg/ml de tetraciclina tanto a 24 como a 48 horas, 3xFLAG-TbRRM1 se localiza en núcleo y citoplasma en aproximadamente un 10 % de la población total **(Figura 34)**.

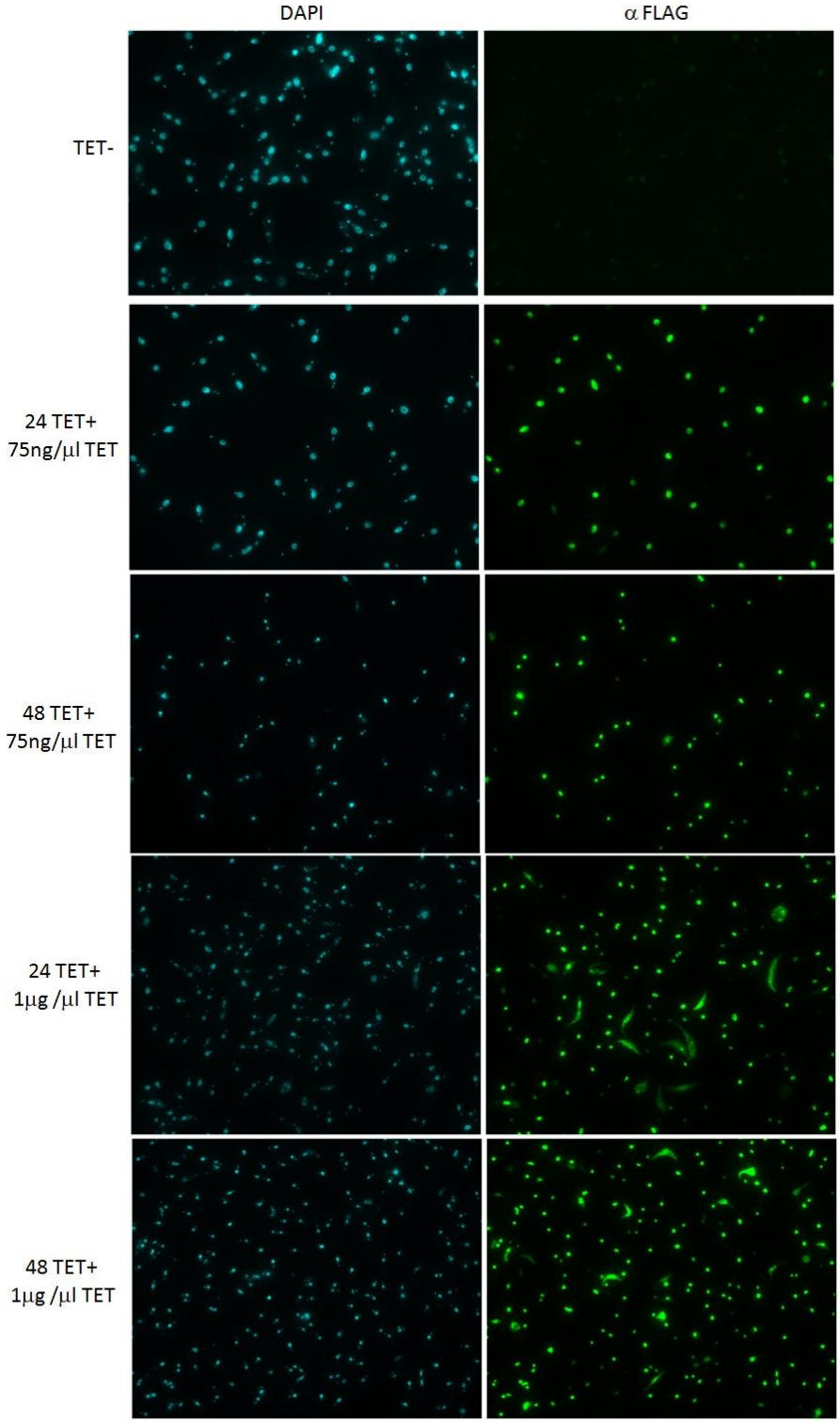

Figura 34. Localización subcelular de la proteína ectópica 3xFLAG-TbRRM1. Fotos de inmunofluorescencia indirecta a distintos tiempos y concentraciones de TET en parásitos procíclicos del clon G11.A que sobreexpresan *3xFLAG-TbRRM1*.

D.2) Morfologías de los parásitos del clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*)

A continuación se analizaron las morfologías observadas luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* a distintas concentraciones y tiempos de inducción con tetraciclina. Se realizó la marcación de núcleos y kinetoplastos con DAPI en cultivos control sin inducir (TET-) y en cultivos inducidos con 75 ng/ml ó 1 µg/ml de tetraciclina (TET+) por 24 o 48 horas. Al analizar las fotografías se observó, sorpresivamente, que luego de 24 horas de inducción con 75 ng/ml se encuentran parásitos con morfología que coincide con el fenotipo *nozzle*, observado previamente para la depleción de TbRRM1 en el estadio procíclico [80]. Además se encontraron parásitos zooides y con configuración de núcleos y kinetoplastos aberrantes **(Figura 35)**.

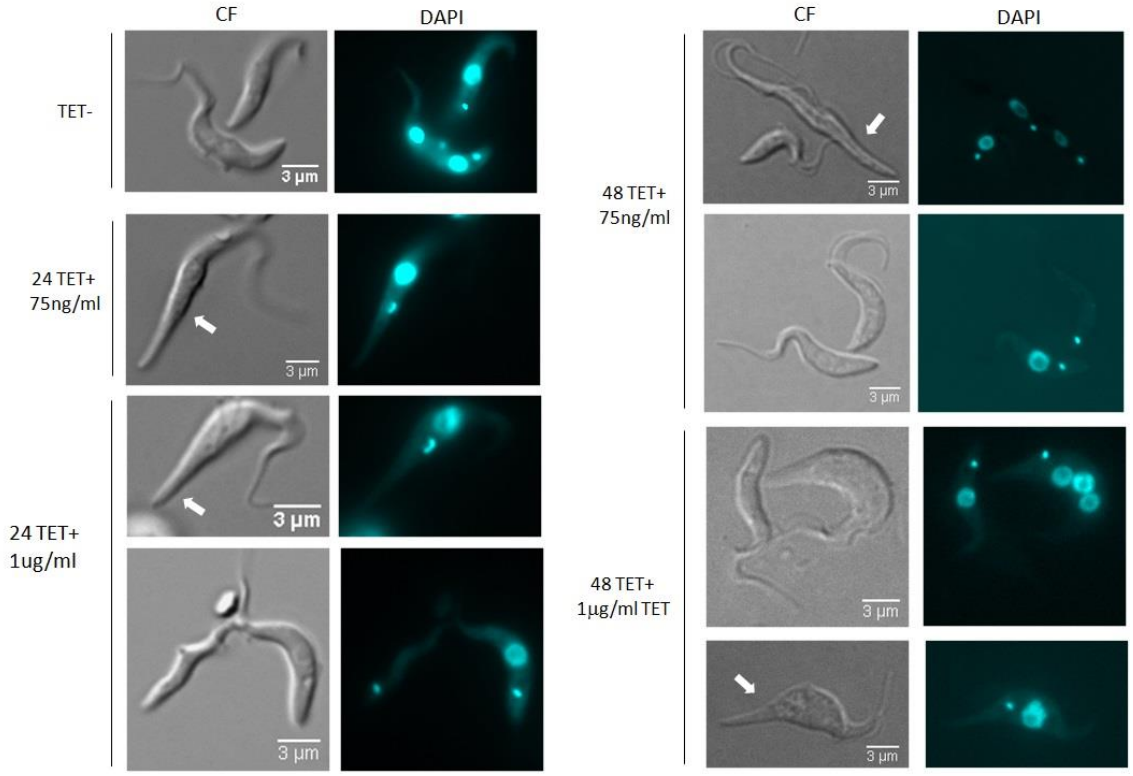

Figura 35. Morfologías observadas al sobreexpresar *3xFLAG-TbRRM1* en el clon G11.A. Fotos de microscopía de parásitos del clon G11.A que sobreexpresan *3xFLAG-TbRRM1* marcados con DAPI a distintos tiempos y concentraciones de TET. Las flechas indican parásitos con fenotipo *nozzle*.

D.3) Cuantificación de la configuración de núcleos y kinetoplastos en el clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*).

Dado que en las microscopías con marcación con DAPI se observaron fenotipos aberrantes luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*, se decidió realizar la cuantificación de las configuraciones de núcleos y kinetoplastos y de las morfologías aberrantes. Para ello, cultivos sin inducir (TET-) y luego de 24 ó 48 horas de inducción con 75 ng/ml ó 1 µg/ml de tetraciclina (TET+) fueron marcados con DAPI y estudiados por microscopía. Al analizar las fotografías se observó un aumento en el porcentaje de parásitos con configuraciones núcleo/kinetoplasto aberrantes y zooides, sin embargo las diferencias no fueron significativas con respecto al control sin inducir. **(Figura 36**, zooides y aberrantes**)**.

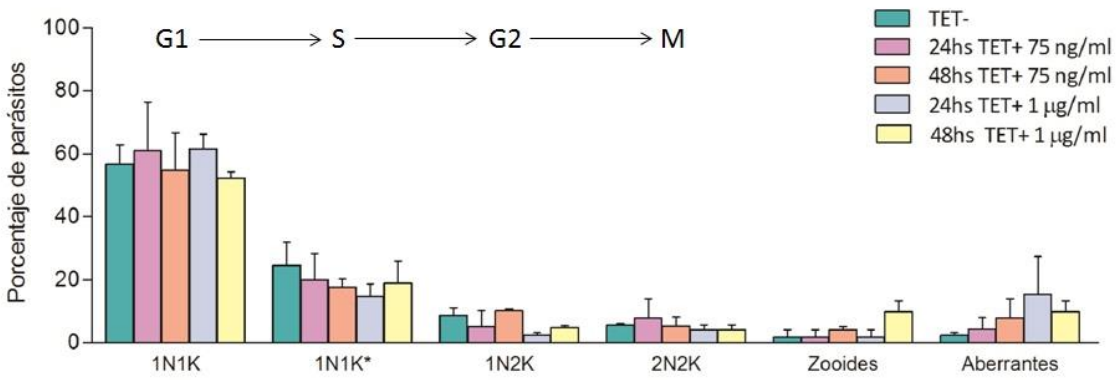

Figura 36. Cuantificación de la configuración núcleo/kinetoplasto luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en el clon G11.A. Ensayo de cuantificación de la configuración de núcleos (N) y kinetoplastos (K) mediante tinción con DAPI y microscopía en el clon G11.A luego de la inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* a distintos tiempos y concentraciones de TET. Los gráficos corresponden a la media y el desvío estándar de 120 células en dos réplicas biológicas independiente. Test *t* de student.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las configuraciones de núcleos y kinetoplastos en los parásitos que sobreexpresan *3xFLAG-TbRRM1* para ninguna de las concentraciones de tetraciclina y tiempos de inducción ensayados.

Este resultado indica que el ciclo celular (estudiado mediante la cuantificación de las configuraciones de núcleos y kinetoplastos), no se ve alterado luego de la sobreexpresión de la proteína ectópica.

Además, al calcular los tiempos de duplicación en el clon G11.A, no se observaron diferencias con respecto al control sin inducir **(Figura 37)**.

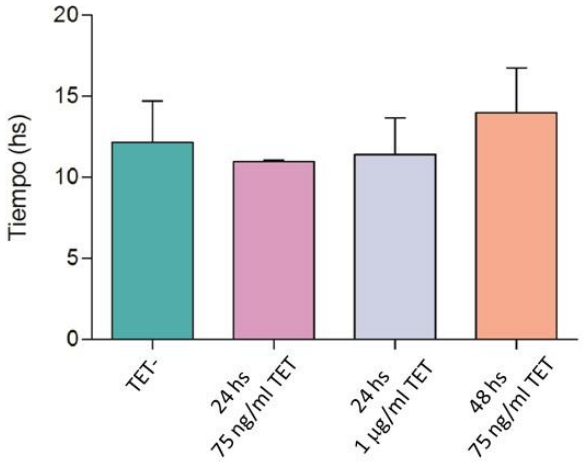

Figura 37. Tiempo de duplicación luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en el clon G11.A. Se calcularon los tiempos de duplicación en el clon G11.A luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* a partir de los valores de densidad de parásitos a distintos tiempos y concentraciones de TET, utilizando la siguiente fórmula: Td= ln2/k, donde *k* representa la velocidad de crecimiento del cultivo y puede calcularse como: k= -ln (d2/d1)/t2-t1, donde *d* corresponde a la densidad de parásitos y *t* al tiempo. Test *t* de student en comparación con las muestras TET-.

Dado que ni la cuantificación de las configuraciones de núcleos y kinetoplastos ni los tiempos de duplicación se vieron afectados luego de la sobreexpresión *3xFLAG-TbRRM1* con 75 ó 1000 ng/ml de tetraciclina en los dos tiempos ensayados, puede sugerirse que la expresión ectópica de *3xFLAG-TbRRM1* no afecta la progresión normal del ciclo celular.

Sin embargo, para confirmar esto último debe analizarse el ciclo celular por marcación con ioduro de propidio y citometría de flujo.

D.4) Cuantificación de las distancias núcleo/kinetoplasto y kinetoplasto/extremo posterior en el clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*).

Dado queal sobreexpresar *3xFLAG-TbRRM1* se observaron parásitos con extremo posterior alargado, se decidió realizar la medición de las distancias entre el núcleo y el kinetoplasto (NK) y entre el kinetoplasto y el extremo posterior (KP) en cultivos control (TET-) y luego de 24 ó 48 horas de inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* (TET+) con 75 ó 1000 ng/ml de tetraciclina. Las mediciones se realizaron en parásitos con configuración núcleo/kinetoplasto 1N1K. Al analizar las distancias NK se observó un incremento significativo a las 48 horas post-inducción con 1 µg/ml de TET. Además, las distancias KP aumentaron significativamente luego de 48 horas del agregado de 75 ó 1000 ng/ml de tetraciclina **(Figura 38)**.

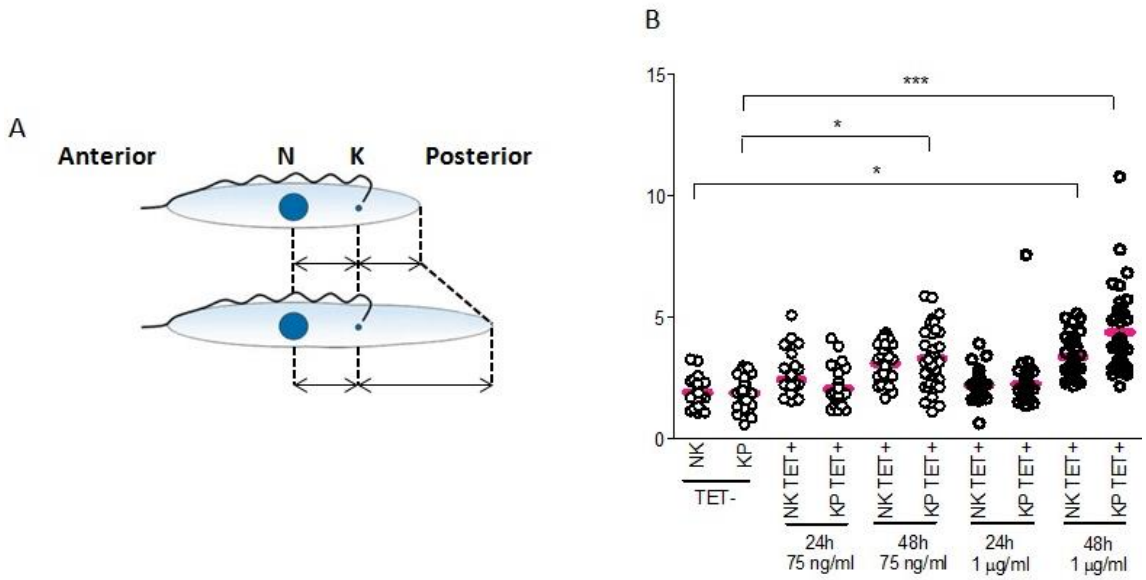

Figura 38. Análisis morfométrico luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en el clon G11.A. (A) Esquema representando las dimensiones entre el NK y el KP en parásitos con morfología normal y con el extremo KP alargado, adaptado de *K. R. Matthews*, 2015 [43]. **(B)** Gráfico de las distancias NK y KP en parásitos con configuración 1N1K del clon G11.A luego de 24 ó 48 horas de inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* con 75 ó 1000 ng/ml de TET. Se contabilizaron 120 parásitos en dos réplicas biológicas independientes. Test *t* de student. *p<0,05 ; ***p<0.001.

D.5) Cuantificación del porcentaje de parásitos con fenotipo nozzle en el clon G11.A (sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*).

Luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* se observaron parásitos con el extremo kineto/posterior alargado **(Figura 35)**. Esta distancia resultó significativa luego de 48 horas de inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* con 75 ó 1000 ng/ml de tetraciclina **(Figura 38 B)**.

Para determinar si los parásitos con el extremo posterior alargado son considerados *nozzle*, se estableció el siguiente criterio: si la distancia KP es mayor a la media de la distancia en el control sin inducir (TET-) más dos desvíos estándar (2xDS), el parásito se considera *nozzle* [80]. Este parámetro, establecido en relación a la población control sin inducir, fue de 3,6 µm. Por lo tanto, aquellos parásitos que presenten una distancia KP mayor a 3,6 µm fueron considerados *nozzle*. Analizando las distancias KP para el control sin inducir y para cultivos inducidos con 75 ó 1000 ng/ml de TET por 24 ó 48 horas, se calculó el porcentaje de parásitos con fenotipo *nozzle* para cada condición.

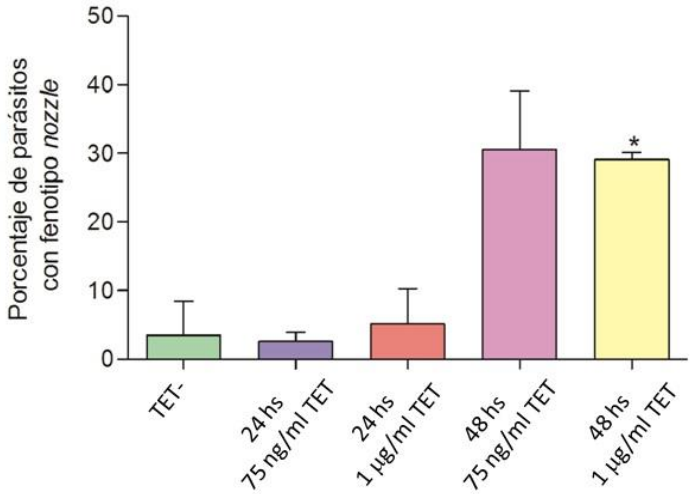

Figura 39. Porcentaje de parásitos con fenotipo *nozzle* luego de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en el clon G11.A. Se representan los porcentajes de parásitos con fenotipo *nozzle*, considerando aquellas células que tienen una distancia KP mayor a 3,6 µm en cultivos control sin inducir (TET-) y luego de distintas concentraciones y tiempos de inducción con TET. Test *t* de student. * $p<0.05$.

Luego de 48 horas de inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* con 1 µg/ml de TET, aproximadamente un 30% de los parásitos presentan morfología compatible con el fenotipo *nozzle* **(Figura 39)**.

Este resultado confirma lo observado por el análisis de las morfologías por microscopía **(Figura 35)** corroborando que la sobreexpresión *de 3xFLAG-TbRRM1* produce fenotipo *nozzle*, al igual que lo visto anteriormente al inducir su silenciamiento por ARNi [80].

Discusión

Discusión

Los Tripanosomátidos producen enfermedades devastadoras en humanos y animales. Los fármacos actuales para tratar las Tripanosomiasis son poco tolerados por los pacientes debido a su alta toxicidad y sólo son efectivos durante la etapa aguda de la enfermedad [117].

En cuanto a la Tripanosomiasis Africana, a finales de la década de 1970 se identificó el fexinidazol como una posible droga para el tratamiento [118], y actualmente se encuentra en fase 2/3 de un ensayo clínico [119]. Si bien estos hallazgos son prometedores, de ser registrado y aprobado como tratamiento para la Tripanosomiasis Africana Humana, el fexinidazol representaría una terapia efectiva sólo contra la infección causada por *T. b. gambiense* [120]. Por lo tanto, continúa la necesidad de búsqueda de nuevos blancos de drogas para tratar estas enfermedades desatendidas.

Considerando que los Tripanosomátidos presentan un metabolismo de ARN poco común, las proteínas involucradas en su regulación, como las proteínas de unión a ARN (RBPs), son candidatas potenciales para el desarrollo de nuevas terapias.

En nuestro laboratorio se comenzó el estudio de la proteína de unión a ARN TbRRM1, desarrollando un sistema estable para su silenciamiento inducible por tetraciclina en el estadio procíclico de *T. brucei*. Mediante este sistema se demostró que TbRRM1 es esencial para la sobrevida de los parásitos ya que, luego de 48 horas de inducida su depleción, los mismos mueren por un proceso apoptótico [80]. Además, se observó que luego de inducida la depleción de TbRRM1 aproximadamente un tercio de los mensajeros presentaban sus niveles disminuidos [84].

Dada la importancia de TbRRM1 se decidió continuar por un lado, con su caracterización en el estadio procíclico y por otro lado, comenzar a estudiar el rol de esta proteína en el estadio sanguíneo.

Primeramente comenzamos a estudiar la localización subcelular de TbRRM1 en el estadio sanguíneo. Mediante inmunofluorescencia indirecta observamos que en este estadio TbRRM1 se localiza preferentemente en el núcleo y se observa, además, una pequeña proporción de proteína en el citoplasma, a diferencia del estadio procíclico donde se vio que sería exclusivamente nuclear

(Figura 14). La localización de TbRRM1 en el citoplasma en parásitos sanguíneos indica que la proteína tendría roles adicionales en este estadio ya que podría interactuar con moléculas presentes en el citoplasma. Además, ensayos de inmunoprecipitación del ARN seguido de secuenciación (RIP-Seq) realizados por *Naguleswaran y Col*. en 2015 demostraron que, en el estadio procíclico de *T. brucei,* TbRRM1 se asocia a mensajeros propios de la forma sanguínea en el núcleo. Posiblemente TbRRM1 esté regulando el transporte de estos mensajeros del núcleo al citoplasma para evitar su traducción en el estadio procíclico [84] y esto podría explicar la localización de TbRRM1 en el citoplasma en el estadio sanguíneo. Por otra parte, en base a su localización subcelular, TbRRM1 podría tener diferentes interactores en el estadio sanguíneo (aún no estudiados) a los previamente identificados en procíclicos (factor de elongación 1-α, helicasa dependiente de ADN, proteína ribosomal 68s L9, entre otros. Datos no publicados).

Con el objetivo de continuar con la caracterización de TbRRM1, se estableció un sistema estable para su silenciamiento inducible por ARNi en el estadio sanguíneo. Se comenzó estudiando el efecto de la depleción de TbRRM1 en el crecimiento de los parásitos y se observó que la curva cae significativamente a partir de las 12 horas post-inducción **(Figura 17 A)**, demostrando que TbRRM1 es relevante para el crecimiento, tal como ha sido visto para el estadio procíclico [80]. Para determinar si el defecto en el crecimiento luego de las 12 horas de inducido el ARNi de *TbRRM1* se debe a la muerte de los parásitos, se realizaron ensayos de viabilidad celular por marcación con Rhodamina123 e ioduro de propidio. Mediante esta técnica se demostró que la viabilidad celular comienza a disminuir recién a partir de las 48 horas de inducida la depleción de la proteína **(Figura 21)**. Más aún, los ensayos de pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Ψ) **(Figura 28)** y de marcación con Anexina V-FITC e ioduro de propidio para el estadio sanguíneo **(Figura 29)** sugirieron que la muerte celular se produce por un mecanismo de tipo apoptótico a partir de las 48 horas post-inducción. Además, el estudio de los tiempos de duplicación en parásitos sanguíneos demostró que a partir de las 12 horas del agregado de TET el tiempo de división se incrementa **(Figura 17 B)**. Estos resultados en conjunto indican que entre las 12 y 48 horas de inducido el ARNi de *TbRRM1* el defecto en el crecimiento de los parásitos no se debe a la pérdida de viabilidad,

sugiriendo un retraso en el ciclo de división celular luego de la depleción de TbRRM1 en el estadio sanguíneo.

Por otro lado, en el estadio procíclico, la curva de crecimiento comienza a verse afectada luego de 48 horas de inducida la depleción de TbRRM1 [80], mientras que la viabilidad celular analizada por marcación con Rhodamina123 e ioduro de propidio disminuye a partir de las 72 horas del agregado de TET **(Figura 21)**. Sin embargo, en este estadio el porcentaje de parásitos con potencial de membrana mitocondrial (Ψ) disminuido comienza a incrementarse a partir de las 24 horas de inducida la depleción de TbRRM1 **(Figura 28)**. Por lo tanto, el incremento de parásitos con Ψ disminuído se observa antes de los defectos en la curva de crecimiento y la pérdida de viabilidad, resultado que puede explicarse teniendo en cuenta que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial es un evento temprano en el proceso de muerte celular [121; 122].

Dado que los resultados de las curvas de crecimiento y viabilidad sugieren algún tipo de retraso en la división, se continuó estudiando el ciclo celular por cuantificación de la configuración de núcleos (N) y kinetoplastos (K), y por citometría de flujo en ambos estadios.

Para el estadio procíclico se observó una disminución de parásitos en fase S nuclear (1N1K*) y en fase G2/M (2N2K) **(Figura 24 B** y **Figura 26)**. Además se evidenció un aumento en el porcentaje de parásitos aberrantes **(Figura 24 B**; otros, zooides**)**, con núcleos y/o kinetoplastos mal distribuidos **(Figura 24 D,** 2N2K#**)** o con una configuración anormal de los mismos **(Figura 24 B,** 2N1K**)**. La aparición de parásitos 2N1K y zooides (0N1K) puede deberse a una división incorrecta de células 2N2K, indicando problemas en la segregación nuclear luego de inducida la depleción de TbRRM1 en el estadio procíclico [107].

Para el estadio sanguíneo, se observó un incremento de aproximadamente el 9 % en el porcentaje de parásitos con configuración 1N1K luego de 12 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1* **(Figura 24 A)**. Este hallazgo puede relacionarse con la diferenciación de la forma replicativa *long slender* a la forma quiescente *short stumpy* durante el ciclo de vida del estadio sanguíneo **(Figura 6)**, ya que la forma no replicativa se encuentra arrestada en fase G0/G1 del ciclo celular (1N1K). Por lo tanto, el aumento de parásitos con configuración 1N1K luego de 12 horas post-inducción del ARNi de *TbRRM1* podría indicar que la proteína estaría involucrada en la diferenciación de la forma sanguínea

long slender a la forma *short stumpy*. Sin embargo, mediante el estudio de ciclo celular por marcación con ioduro de propidio y citometría de flujo no se observó la acumulación de parásitos en fase G1 del ciclo celular luego de 12 horas de inducida la depleción de TbRRM1 **(Figura 25)**. Este dato coincidió parcialmente con los resultados preliminares de las mediciones de algunos mRNAs propios de la diferenciación a la forma *short stumpy* (como PAD1, PAD2 y VSG221, entre otros (datos no mostrados)).

La discrepancia entre los resultados del análisis de ciclo celular obtenidos por citometría de flujo y por cuantificación de la configuración de núcleos y kinetoplastos puede deberse a que este último se encuentra sesgado a la interpretación del operador. Por otro lado, el estudio del ciclo celular por citometría de flujo es un análisis cuantitativo donde se realiza la cuantificación del contenido de ADN pero no de la distribución ni de la cantidad de núcleos y kinetoplastos, en el cual tampoco puede cuantificarse el ADN del núcleo y del kinetoplasto por separado [123]. Por lo tanto, para analizar el ciclo celular en detalle deben combinarse ambas técnicas.

Por otro lado, los resultados de citometría de flujo en este estadio confirmaron la disminución de parásitos en fase S del ciclo celular (1N1K*). Además, se observó la aparición de una población hipodiploide a partir de las 12 horas post-inducción, la cual puede corresponderse tanto a parásitos zooides como a parásitos en proceso de muerte celular por apoptosis, en los cuales el ADN se fragmenta, evidenciando un contenido menor al que se observa en fase G1 del ciclo celular **(Figura 25)**. Luego de 48 horas del agregado de TET, el porcentaje de parásitos hipodiploides alcanzó un 49,3%. Este resultado junto con la pérdida del potencial de membrana **(Figura 27)** y la marcación con Anexina V-FITC e ioduro de propidio **(Figura 29)** sugieren que la depleción de TbRRM1 produce muerte celular por un mecanismo de tipo apoptótico en el estadio sanguíneo.

Además, se evaluaron las morfologías de los parásitos del estadio sanguíneo luego del silenciamiento de *TbRRM1*, observándose fenotipos aberrantes como parásitos con flagelo desprendido o un incremento de células conectadas por su extremo posterior **(Figura 22)**.

Con respecto al fenotipo de flagelo desprendido observado a partir de las 12 horas de inducido el silenciamiento de *TbRRM1*, se sabe que la adhesión del

flagelo al cuerpo celular está mediada por la zona de anclaje del flagelo (FAZ) [124] y que dicha unión es esencial. La unión del flagelo al cuerpo del parásito no sólo define el eje de división celular [107] o el desplazamiento [125], sino que también se ha visto que es necesaria para que ocurran otros procesos como por ejemplo, la endocitosis en epimastigotes de *T. cruzi* [126].

Dado que el flagelo es esencial para la citoquinesis, el desprendimiento del mismo puede llevar a defectos en la división celular, provocando la acumulación de células conectadas con su extremo posterior **(Figura 22 A** y **C)**, que no pueden completar correctamente la división celular [108].

Si bien TbRRM1 es una proteína mayoritariamente nuclear, se ha visto este fenotipo luego del silenciamiento de otras proteínas no relacionadas al flagelo [127], lo que indica que la adhesión del mismo al cuerpo celular podría estar regulada de manera indirecta, o mediante procesos de regulación transcripcionales o post-transcripcionales de genes que codifican para proteínas implicadas en la formación y ensamblaje del flagelo.

Una vez evaluados los efectos de la depleción de TbRRM1, nos propusimos evaluar los efectos de la sobreexpresión de la proteína en el estadio procíclico. Para ello, se estableció un sistema estable para la sobreexpresión inducible de una versión etiquetada de la proteína con el objetivo de, por un lado, complementar el silenciamiento en la línea 5'UTR y rescatar con la versión ectópica el fenotipo letal causado por la depleción de TbRRM1 y, por el otro, estudiar el efecto de su sobreexpresión en el estadio procíclico.

En primer lugar, se puso a punto la concentración de tetraciclina (TET) necesaria para inducir el silenciamiento de *TbRRM1* en la línea 5'UTR y se determinó que, a partir de 24 horas del agregado de 10 ng/ml de TET la proteína no es detectable por western blot **(Figura 31 B)**, sin embargo la curva de crecimiento en estos parásitos comenzó a verse afectada a partir del agregado de 50 ng/ml de TET luego de 48 horas post-inducción **(Figura 31 A)**. A partir de 50 ng/ml de inductor, TbRRM1 no es detectable por western blot y la curva de crecimiento comienza a verse afectada, lo que indica que a partir de esta concentración *TbRRM1* se silencia por completo.

Mediante el ensayo de complementación por sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en la línea celular que expresa el ARNi de *TbRRM1*, se determinó que al inducir con concentraciones de TET entre 50 ng/ml y 100 ng/ml el

crecimiento de los parásitos depletados de TbRRM1 se complementa con la expresión de la versión ectópica de la proteína ya que no se observan diferencias en la curva de crecimiento con respecto al control sin inducir en este rango de concentraciones de tetraciclina **(Figura 32 A)**. Más aún, tampoco se observaron los fenotipos aberrantes descriptos previamente para el silenciamiento de *TbRRM1*.

De esta manera, se logró optimizar y titular el sistema de complementación en un rango de concentraciones de tetraciclina, lo que permitirá evaluar la relevancia de los distintos dominios de TbRRM1 mediante la sobreexpresión de versiones mutantes. Actualmente, contamos con una construcción para la sobreexpresión de una versión de *3xFLAG-TbRRM1* con el primer dominio dedos de zinc mutado. La expresión de este mutante en el contexto del ARNi de *TbRRM1* nos brindará información acerca de la relevancia de este dominio ya que, si no complementa el fenotipo letal, el primer dedo de zinc podrá ser considerado un dominio esencial para la funcionalidad de la proteína.

A continuación, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en la curva de crecimiento de parásitos del estadio procíclico y se observó que, luego de 48 horas de inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*, la curva de crecimiento comienza a verse afectada indicando que la sobreexpresión de la proteína en un contexto *wild-type* también resulta deletérea **(Figura 33 A)**.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se observó que al inducir con altas concentraciones de TET algunos parásitos presentan localización tanto nuclear como citoplasmática de 3xFLAG-TbRRM1 **(Figura 34)**. El porcentaje de parásitos con 3xFLAG-TbRRM1 en núcleo y citoplasma fue menor al 10 % luego de 48 horas de inducción con 1 µg/ml de TET. Por lo tanto, dado que en la mayoría de los parásitos 3xFLAG-TbRRM1 presenta la misma localización subcelular que la proteína endógena, el defecto en la curva de crecimiento no estaría relacionado en su totalidad con la localización de la proteína ectópica.

Continuando con el estudio del efecto de la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1* en parásitos *wild-type*, al analizar las morfologías obtenidas se observó la aparición de parásitos con su extremo posterior alargado, compatible con el fenotipo *nozzle* **(Figura 35)**.

La aparición de este fenotipo tampoco estaría relacionado en su totalidad con la localización citoplasmática de la proteína ectópica, ya que el porcentaje de

parásitos que presentan una localización distinta a la de la proteína endógena es bajo (menor al 10 %) con respecto al porcentaje de parásitos con fenotipo *nozzle* (de aproximadamente un 30% luego de 48 horas de inducida la sobreexpresión de *3xFLAG-TbRRM1*) **(Figura 39)**. La proporción de parásitos con fenotipo *nozzle* luego de la expresión ectópica de la proteína coincide con los valores observados a las 24 horas post-inducción del ARNi de *TbRRM1* (~40%) [80].

El análisis de las morfologías obtenidas luego de sobreexpresar *3xFLAG-TbRRM1* en conjunto con lo observado luego de la depleción de la proteína, indican que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de *TbRRM1* producen la misma morfología aberrante. El fenotipo *nozzle* implica una extensión de microtúbulos sólo en el extremo posterior del parásito [81] y ha sido reportado para el silenciamiento o la sobreexpresión de genes no relacionados al citoesqueleto [81; 99; 100; 129]. Esto sugiere que la formación del citoesqueleto estaría regulada por vías metabólicas distintas. Si bien la morfología *nozzle* no puede relacionarse directamente con la función de TbRRM1, constituye un hallazgo novedoso ya que es la primera vez que se reporta este fenotipo tanto para el silenciamiento como para la sobreexpresión de una misma proteína.

Más aún, el defecto en la sobrevida del parásito observado tanto al sobreexpresar como al silenciar *TbRRM1* constituye un hallazgo novedoso. Este resultado, que también ha sido reportado, por ejemplo, tanto al silenciar como al sobreexpresar a la proteína de unión a ARN DRBD13 de *T. brucei* [101], resulta interesante ya que son pocos los reportes en donde el silenciamiento y la sobreexpresión de una misma proteína sean deletéreos para la sobrevida del parásito.

En conjunto, los resultados llevados a cabo en esta Tesis demuestran que TbRRM1 es una proteína de unión a ARN esencial en ambos estadios de *T. brucei*. Además, dado que tanto el silenciamiento como la sobreexpresión de *TbRRM1* resultan deletéreos para la sobrevida del parásito, puede concluirse que TbRRM1 es una proteína relevante cuyos niveles deben estar finamente regulados.

Finalmente, dado que TbRRM1 es una proteína esencial y relevante para la sobrevida del parásito y que no posee ortólogos en humanos, los resultados aquí mostrados sugieren que podría considerarse como un candidato prometedor para la intervención terapéutica de estas enfermedades desatendidas.

Como perspectivas a futuro, nos planteamos realizar el ensayo de sobreexpresión de *TbRRM1* sin la etiqueta 3xFLAG con el objetivo de descartar que los efectos en la curva de crecimiento y los fenotipos aberrantes observados no sean causados por la sobreexpresión de *3xFLAG.*

Por otro lado, en el laboratorio está siendo desarrollando un sistema para la sobreexpresión inducible de *TbRRM1* utilizando otro inductor, el ácido vaníllico [129]. Esto permitirá tener un mejor control en los tiempos de inducción del ARNi y sobreexpresión de la proteína ectópica con el objetivo de optimizar, aún más, el sistema de complementación.

Bibliografía

Bibliografía

1. de Souza, W. (2008). An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. Curr. Pharm. Des. *14*, 822–838.
2. Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. Mol. Microbiol. *53*, 717–724.
3. Docampo, R., and Moreno, S. N. (1999). Acidocalcisome: A novel Ca2+ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. Parasitol Today (Regul Ed) *15*, 443–448.
4. Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., and Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J. Clin. Invest. *118*, 1301–1310.
5. Shapiro, T. A., and Englund, P. T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu. Rev. Microbiol. *49*, 117–143.
6. Cavalcanti, D. P., and de Souza, W. (2018). The kinetoplast of trypanosomatids: from early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. Scanning *2018*, 9603051.
7. Sherwin, T., and Gull, K. (1989). The cell division cycle of Trypanosoma brucei brucei: timing of event markers and cytoskeletal modulations. Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci *323*, 573–588.
8. Overath, P., Stierhof, Y. D., and Wiese, M. (1997). Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. Trends Cell Biol. *7*, 27–33.
9. Yao, C. (2010). Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? Infect. Immun. *78*, 22–31.
10. Berthier, D., Brenière, S. F., Bras-Gonçalves, R., Lemesre, J.-L., Jamonneau, V., Solano, P., Lejon, V., Thévenon, S., and Bucheton, B. (2016). Tolerance to trypanosomatids: A threat, or a key for disease elimination? Trends Parasitol. *32*, 157–168.
11. Franco, J. R., Simarro, P. P., Diarra, A., and Jannin, J. G. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. Clin. Epidemiol. *6*, 257–275.
12. World Health Organization (2012). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organ. Tech. Rep. Ser., v–xii, 1.
13. Morrison, L. J. (2011). Parasite-driven pathogenesis in Trypanosoma brucei infections. Parasite Immunol. *33*, 448–455.

14. Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem. Inst. Oswaldo Cruz *102 Suppl 1*, 75–85.

15. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. www.who.int.

    La Enfermedad de Chagas: www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)

16. Organización Panamericana de la Salud (OPS)

    Enfermedad de Chagas: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad chagas&Itemid=40370&lang=es

17. Dias JCP, Ramos Jr AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol Serv Saúde. 2016;25(spe):7-86

18. Toso MA, Vial UF, Galanti N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev Med Chile; 139: 258-266

19. Dvorak, J. A., and Hyde, T. P. (1973). Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp. Parasitol. *34*, 268–283.

20. Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect. Dis. *1*, 92–100.

21. Rassi, A., Rassi, A., Little, W. C., Xavier, S. S., Rassi, S. G., Rassi, A. G., Rassi, G. G., Hasslocher-Moreno, A., Sousa, A. S., and Scanavacca, M. I. (2006). Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. N. Engl. J. Med. *355*, 799–808.

22. Gironès, N., Cuervo, H., and Fresno, M. (2005). Trypanosoma cruzi-induced molecular mimicry and Chagas' disease. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *296*, 89–123.

23. de Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., and Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. Am. J. Clin. Dermatol. *16*, 99–109.

24. Killick-Kendrick, R. (1990). The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann. Parasitol. Hum. Comp. *65 Suppl 1*, 37–42.

25. Handman, E., and Bullen, D. V. R. (2002). Interaction of Leishmania with the host macrophage. Trends Parasitol. *18*, 332–334.

26. Pearson, R. D., and Sousa, A. Q. (1996). Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin. Infect. Dis. *22*, 1–13.

27. Yoneyama, K. A. G., de Peder, L. D., Lonardoni, M. V. C., and Silveira, T. G. V. (2007). Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Paraná State, Brazil. Braz. J. Infect. Dis. *11*, 360–364.

28. Ghorbani, M., and Farhoudi, R. (2018). Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? Drug Des. Devel. Ther. *12*, 25–40.

29. Gadisa, E., Tsegaw, T., Abera, A., Elnaiem, D.-E., den Boer, M., Aseffa, A., and Jorge, A. (2015). Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in Ethiopia. Parasit. Vectors *8*, 381.

30. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., and WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE *7*, e35671.

31. Ahluwalia, S., Lawn, S. D., Kanagalingam, J., Grant, H., and Lockwood, D. N. J. (2004). Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. BMJ *329*, 842–844.

32. Fernandes, A. P., Costa, M. M. S., Coelho, E. A. F., Michalick, M. S. M., de Freitas, E., Melo, M. N., Luiz Tafuri, W., Resende, D. de M., Hermont, V., Abrantes, C. de F., et al. (2008). Protective immunity against challenge with Leishmania (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. Vaccine *26*, 5888–5895.

33. Khamesipour, A., Rafati, S., Davoudi, N., Maboudi, F., and Modabber, F. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. Indian J. Med. Res. *123*, 423–438.

34. Parra, L. E., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Souza, L. O. P., Palatnik-de-Sousa, C. B., and Menz, I. (2007). Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. Vaccine *25*, 2180–2186.

35. Srivastava, S., Shankar, P., Mishra, J., and Singh, S. (2016). Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. Parasit. Vectors *9*, 277.

36. Brun, R., and Blum, J. (2012). Human African trypanosomiasis. Infect. Dis. Clin. North Am. *26*, 261–273.

37. Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., and Burri, C. (2010). Human African trypanosomiasis. Lancet *375*, 148–159.

38. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. www.who.int. La Tripanosomiasis Africana: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness).

39. Steverding, D. (2010). The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. Parasit. Vectors *3*, 15.

40. Langousis, G., and Hill, K. L. (2014). Motility and more: the flagellum of Trypanosoma brucei. Nat. Rev. Microbiol. *12*, 505–518.

41. McCulloch, R. (2004). Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. Trends Parasitol. *20*, 117–121.

42. Pays, E., Vanhamme, L., and Pérez-Morga, D. (2004). Antigenic variation in Trypanosoma brucei: facts, challenges and mysteries. Curr. Opin. Microbiol. *7*, 369–374.

43. Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of Trypanosoma brucei. J. Cell Sci. *118*, 283–290.

44. de Vries, M. G., Arseneau, L. M., Lawson, M. E., and Beverly, J. L. (2003). Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia. Diabetes *52*, 2767–2773.

45. Trindade, S., Rijo-Ferreira, F., Carvalho, T., Pinto-Neves, D., Guegan, F., Aresta-Branco, F., Bento, F., Young, S. A., Pinto, A., Van Den Abbeele, J., et al. (2016). Trypanosoma brucei Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. Cell Host Microbe *19*, 837–848.

46. Vanhamme, L., and Pays, E. (1995). Control of gene expression in trypanosomes. Microbiol. Rev. *59*, 223–240.

47. Balogun, R. A. (1974). Studies on the amino acids of the tsetse fly, Glossina morsitans, maintained on in vitro and in vivo feeding systems. Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. *49*, 215–222.

48. Smith, T. K., Bringaud, F., Nolan, D. P., and Figueiredo, L. M. (2017). Metabolic reprogramming during the Trypanosoma brucei life cycle. [version 2; referees: 4 approved]. F1000Res. *6*.

49. De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasch, A. C., and Cassola, A. (2011). Gene expression regulation in trypanosomatids. Essays Biochem. *51*, 31–46.

50. Teixeira, S. M. (1998). Control of gene expression in Trypanosomatidae. Braz. J. Med. Biol. Res. *31*, 1503–1516.

51. Günzl, A., Ullu, E., Dörner, M., Fragoso, S. P., Hoffmann, K. F., Milner, J. D., Morita, Y., Nguu, E. K., Vanacova, S., Wünsch, S., et al. (1997). Transcription of the Trypanosoma brucei spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. Mol. Biochem. Parasitol. *85*, 67–76.

52. Kooter, J. M., and Borst, P. (1984). Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. Nucleic Acids

Res. *12*, 9457–9472.

53. Rudenko, G., Bishop, D., Gottesdiener, K., and Van der Ploeg, L. H. (1989). Alpha-amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream form Trypanosoma brucei. EMBO J. *8*, 4259–4263.

54. Lee, M. G., and Van der Ploeg, L. H. (1997). Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. Annu. Rev. Microbiol. *51*, 463–489.

55. Clayton, C., and Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol. Biochem. Parasitol. *156*, 93–101.

56. Stanne, T. M., and Rudenko, G. (2010). Active VSG expression sites in Trypanosoma brucei are depleted of nucleosomes. Eukaryotic Cell *9*, 136–147.

57. Clayton, C. E. (2014). Networks of gene expression regulation in Trypanosoma brucei. Mol. Biochem. Parasitol. *195*, 96–106.

58. Das, A., Zhang, Q., Palenchar, J. B., Chatterjee, B., Cross, G. A. M., and Bellofatto, V. (2005). Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. Mol. Cell. Biol. *25*, 7314–7322.

59. Schimanski, B., Nguyen, T. N., and Günzl, A. (2005). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in Trypanosoma brucei. Mol. Cell. Biol. *25*, 7303–7313.

60. Manley, J. L., and Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. Genes Dev. *10*, 1569–1579.

61. Gupta, S. K., Kosti, I., Plaut, G., Pivko, A., Tkacz, I. D., Cohen-Chalamish, S., Biswas, D. K., Wachtel, C., Waldman Ben-Asher, H., Carmi, S., et al. (2013). The hnRNP F/H homologue of Trypanosoma brucei is differentially expressed in the two life cycle stages of the parasite and regulates splicing and mRNA stability. Nucleic Acids Res. *41*, 6577–6594.

62. Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., and Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. J. Biomed. Biotechnol. *2010*, 525241.

63. Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *19*, 327–341.

64. Hudson, W. H., and Ortlund, E. A. (2014). The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*,

749–760.

65. Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. RNA *6*, 1197–1211.

66. Birney, E., Kumar, S., and Krainer, A. R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. Nucleic Acids Res. *21*, 5803–5816.

67. Tacke, R., and Manley, J. L. (1999). Determinants of SR protein specificity. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 358–362.

68. Wu, J. Y., and Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. Cell *75*, 1061–1070.

69. De Gaudenzi, J., Frasch, A. C., and Clayton, C. (2005). RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis. Eukaryotic Cell *4*, 2106–2114.

70. Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F. H.-T. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. FEBS J. *272*, 2118–2131.

71. Ge, H., Zuo, P., and Manley, J. L. (1991). Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators. Cell *66*, 373–382.

72. Huang, Y., and Steitz, J. A. (2005). SRprises along a messenger's journey. Mol. Cell *17*, 613–615.

73. Long, J. C., and Caceres, J. F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. Biochem. J. *417*, 15–27.

74. Zhong, X.-Y., Wang, P., Han, J., Rosenfeld, M. G., and Fu, X.-D. (2009). SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. Mol. Cell *35*, 1–10.

75. Manley, J. L., and Krainer, A. R. (2010). A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). Genes Dev. *24*, 1073–1074.

76. Názer, E., Verdún, R. E., and Sánchez, D. O. (2011). Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by actinomycin D and heat shock in Trypanosoma cruzi. PLoS ONE *6*, e19920.

77. Názer, E., Verdún, R. E., and Sánchez, D. O. (2012). Severe heat shock induces nucleolar accumulation of mRNAs in Trypanosoma cruzi. PLoS ONE *7*, e43715.

78. Manger, I. D., and Boothroyd, J. C. (1998). Identification of a nuclear protein in Trypanosoma brucei with homology to RNA-binding proteins

from cis-splicing systems. Mol. Biochem. Parasitol. *97*, 1–11.

79. Gupta, S. K., Chikne, V., Eliaz, D., Tkacz, I. D., Naboishchikov, I., Carmi, S., Waldman Ben-Asher, H., and Michaeli, S. (2014). Two splicing factors carrying serine-arginine motifs, TSR1 and TSR1IP, regulate splicing, mRNA stability, and rRNA processing in Trypanosoma brucei. RNA Biol. *11*, 715–731.

80. Levy, G. V., Bañuelos, C. P., Níttolo, A. G., Ortiz, G. E., Mendiondo, N., Moretti, G., Tekiel, V. S., and Sánchez, D. O. (2015). Depletion of the SR-Related Protein TbRRM1 Leads to Cell Cycle Arrest and Apoptosis-Like Death in Trypanosoma brucei. PLoS ONE *10*, e0136070.

81. Hendriks, E. F., Robinson, D. R., Hinkins, M., and Matthews, K. R. (2001). A novel CCCH protein which modulates differentiation of Trypanosoma brucei to its procyclic form. EMBO J. *20*, 6700–6711.

82. Kilmartin, J. V., Wright, B., and Milstein, C. (1982). Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. J. Cell Biol. *93*, 576–582.

83. Subota, I., Rotureau, B., Blisnick, T., Ngwabyt, S., Durand-Dubief, M., Engstler, M., and Bastin, P. (2011). ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. Mol. Biol. Cell *22*, 4205–4219.

84. Naguleswaran, A., Gunasekera, K., Schimanski, B., Heller, M., Hemphill, A., Ochsenreiter, T., and Roditi, I. (2015). Trypanosoma brucei RRM1 is a nuclear RNA-binding protein and modulator of chromatin structure. MBio *6*, e00114.

85. Bañuelos, C. P., Levy, G. V., Níttolo, A. G., Roser, L. G., Tekiel, V., and Sánchez, D. O. (2019). The Trypanosoma brucei RNA Binding Protein TbRRM1 is Involved in the Transcription of a Subset of RNA Pol II-Dependent Genes. J. Eukaryot. Microbiol.

86. Poon, S. K., Peacock, L., Gibson, W., Gull, K., and Kelly, S. (2012). A modular and optimized single marker system for generating Trypanosoma brucei cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. Open Biol. *2*, 110037.

87. Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G. A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in Trypanosoma brucei. Mol. Biochem. Parasitol. *99*, 89–101.

88. Alsford, S., Wickstead, B., Ersfeld, K., and Gull, K. (2001). Diversity and dynamics of the minichromosomal karyotype in Trypanosoma brucei. Mol. Biochem. Parasitol. *113*, 79–88.

89. Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. L., and Moorman, A. F. M.

(2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci. Lett. *339*, 62–66.

90. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res. *30*, e36.

91. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent e. Coli: “ultra-competent” cells. CSH Protoc. *2006*.

92. Alibu, V. P., Storm, L., Haile, S., Clayton, C., and Horn, D. (2005). A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in Trypanosoma brucei. Mol. Biochem. Parasitol. *139*, 75–82.

93. Zhou, M. Y., and Gomez-Sanchez, C. E. (2000). Universal TA cloning. Curr. Issues Mol. Biol. *2*, 1–7.

94. Beck, J. S. (1961). Variations in the morphological patterns of “autoimmune” nuclear fluorescence. Lancet *1*, 1203–1205.

95. Spector, D. L., Schrier, W. H., and Busch, H. (1983). Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. Biol. Cell *49*, 1–10.

96. Johnson, L. V., Walsh, M. L., and Chen, L. B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc Natl Acad Sci USA *77*, 990–994.

97. Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., and Waterhouse, N. J. (2016). Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. Cold Spring Harb. Protoc. *2016*.

98. Shapiro, H., Alan R. Liss Practical Flow Cytometry. New York, , 1985

99. Hammarton, T. C., Engstler, M., and Mottram, J. C. (2004). The Trypanosoma brucei cyclin, CYC2, is required for cell cycle progression through G1 phase and for maintenance of procyclic form cell morphology. J. Biol. Chem. *279*, 24757–24764.

100. Pasternack, D. A., Sharma, A. I., Olson, C. L., Epting, C. L., and Engman, D. M. (2015). Sphingosine Kinase Regulates Microtubule Dynamics and Organelle Positioning Necessary for Proper G1/S Cell Cycle Transition in Trypanosoma brucei. MBio *6*, e01291-15.

101. Jha, B. A., Gazestani, V. H., Yip, C. W., and Salavati, R. (2015). The DRBD13 RNA binding protein is involved in the insect-stage differentiation process of Trypanosoma brucei. FEBS Lett. *589*, 1966–1974.

102. Li, Z., and Wang, C. C. (2008). KMP-11, a basal body and flagellar protein, is required for cell division in Trypanosoma brucei. Eukaryotic Cell *7*, 1941–1950.

103. Sunter, J. D., Benz, C., Andre, J., Whipple, S., McKean, P. G., Gull, K., Ginger, M. L., and Lukeš, J. (2015). Modulation of flagellum attachment zone protein FLAM3 and regulation of the cell shape in Trypanosoma brucei life cycle transitions. J. Cell Sci. *128*, 3117–3130.

104. LaCount, D. J., Barrett, B., and Donelson, J. E. (2002). Trypanosoma brucei FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. J. Biol. Chem. *277*, 17580–17588.

105. Wilson, C. S., Chang, A. J., Greene, R., Machado, S., Parsons, M. W., Takats, T. A., Zambetti, L. J., and Springer, A. L. (2015). Knockdown of Inner Arm Protein IC138 in Trypanosoma brucei Causes Defective Motility and Flagellar Detachment. PLoS ONE *10*, e0139579.

106. Vaughan, S., Kohl, L., Ngai, I., Wheeler, R. J., and Gull, K. (2008). A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in Trypanosoma brucei. Protist *159*, 127–136.

107. Robinson, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E. H., and Gull, K. (1995). Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. J. Cell Biol. *128*, 1163–1172.

108. Ralston, K. S., Lerner, A. G., Diener, D. R., and Hill, K. L. (2006). Flagellar motility contributes to cytokinesis in Trypanosoma brucei and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. Eukaryotic Cell *5*, 696–711.

109. Wheeler, R. J., Scheumann, N., Wickstead, B., Gull, K., and Vaughan, S. (2013). Cytokinesis in Trypanosoma brucei differs between bloodstream and tsetse trypomastigote forms: implications for microtubule-based morphogenesis and mutant analysis. Mol. Microbiol. *90*, 1339–1355.

110. Woodward, R., and Gull, K. (1990). Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of Trypanosoma brucei. J. Cell Sci. *95 (Pt 1)*, 49–57.

111. Siegel, T. N., Hekstra, D. R., and Cross, G. A. M. (2008). Analysis of the Trypanosoma brucei cell cycle by quantitative DAPI imaging. Mol. Biochem. Parasitol. *160*, 171–174.

112. Siegel, T. N., Kawahara, T., Degrasse, J. A., Janzen, C. J., Horn, D., and Cross, G. A. M. (2008). Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in Trypanosoma brucei. Mol. Microbiol. *67*, 762–771.

113. Briggs, L. J., McKean, P. G., Baines, A., Moreira-Leite, F., Davidge, J., Vaughan, S., and Gull, K. (2004). The flagella connector of Trypanosoma brucei: an unusual mobile transmembrane junction. J. Cell Sci. *117*, 1641–1651.

114. Duszenko, M., Figarella, K., Macleod, E. T., and Welburn, S. C. (2006). Death of a trypanosome: a selfish altruism. Trends Parasitol. *22*, 536–542.

115. Chen, L. B. (1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. Annu. Rev. Cell Biol. *4*, 155–181.

116. Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., and Lenaz, G. (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. Biochim. Biophys. Acta *1606*, 137–146.

117. Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R., and Tidwell, R. R. (2007). Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. Br. J. Pharmacol. *152*, 1155–1171.

118. Jennings, F. W., and Urquhart, G. M. (1983). The use of the 2 substituted 5-nitroimidazole, Fexinidazole (Hoe 239) in the treatment of chronic T. brucei infections in mice. Z Parasitenkd *69*, 577–581.

119. Mesu, V. K. B. K., Kalonji, W. M., Bardonneau, C., Mordt, O. V., Blesson, S., Simon, F., Delhomme, S., Bernhard, S., Kuziena, W., Lubaki, J.-P. F., et al. (2018). Oral fexinidazole for late-stage African Trypanosoma brucei gambiense trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial. Lancet *391*, 144–154.

120. Pollastri, M. P. (2018). Fexinidazole: A new drug for african sleeping sickness on the horizon. Trends Parasitol. *34*, 178–179.

121. Ly, J. D., Grubb, D. R., and Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update. Apoptosis *8*, 115–128.

122. Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, C., Vayssière, J. L., Petit, P. X., and Kroemer, G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. J. Exp. Med. *181*, 1661–1672.

123. Wheeler, R. J., Gull, K., and Gluenz, E. (2012). Detailed interrogation of trypanosome cell biology via differential organelle staining and automated image analysis. BMC Biol. *10*, 1.

124. Vickerman, K. (1969). On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. J. Cell Sci. *5*, 163–193.

125. Rodríguez, J. A., Lopez, M. A., Thayer, M. C., Zhao, Y., Oberholzer, M., Chang, D. D., Kisalu, N. K., Penichet, M. L., Helguera, G., Bruinsma, R., et al. (2009). Propulsion of African trypanosomes is driven by bihelical waves with alternating chirality separated by kinks. Proc Natl Acad Sci USA *106*, 19322–19327.

126. Rocha, G. M., Seabra, S. H., de Miranda, K. R., Cunha-e-Silva, N., de Carvalho, T. M. U., and de Souza, W. (2010). Attachment of flagellum to the cell body is important to the kinetics of transferrin uptake by Trypanosoma cruzi. Parasitol. Int. *59*, 629–633.

127. Sienkiewicz, N., Ong, H. B., and Fairlamb, A. H. (2010). Trypanosoma brucei pteridine reductase 1 is essential for survival in vitro and for virulence in mice. Mol. Microbiol. *77*, 658–671.

128. Sunter, J. D. (2016). A vanillic acid inducible expression system for Trypanosoma brucei. Mol. Biochem. Parasitol. *207*, 45–48.

129. Tu, X., and Wang, C. C. (2005). Coupling of posterior cytoskeletal morphogenesis to the G1/S transition in the Trypanosoma brucei cell cycle. Mol. Biol. Cell *16*, 97–105.

Anexo

Anexo

Composición de Buffers y Soluciones

Buffer fosfato salino (PBS) 10X

-NaCl 1,37 M

-KCl 27 mM

-Na_2HPO_4 0,1 M

-KH_2PO_4 18 mM

Se ajustó a pH 7,4 con HCl y se llevó a volumen final con agua miliQ.

Se esterilizó por autoclave. Al momento de usar se diluyó al 1X con agua miliQ.

Buffer fosfato salino glucosa (PSG) 1X

Corresponde al buffer PBS suplementado con 1% (m/v) de glucosa.

Buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,4

Na_2HPO_4 1M 77,4 ml

NaH_2PO_4 1M 22,6 ml

Se llevó a 1 litro de volumen con agua miliQ.

Buffer de dilución- de Trypanosoma (TDB) 5x

-Na_2PO_4 0,1 M

-NaH_2PO_4 10 mM

-NaCl 0,4 M

-KCl 25 mM

-$MgSO_4$ 5 mM

-Glucosa 0,1 M

No es necesario ajustar el pH, debe estar cercano a pH 7,7. De lo contrario indica que uno de los componentes no fue correctamente pesado. Al momento de usar se diluyó al 1X con agua miliQ.

Buffer-Tris-Salino (TBS) 1X

-Tris pH 7,6 1 M

-NaCl 5 M

Se ajustó a pH 7,3 con HCl y se llevó a volumen final con agua miliQ.

Medio super optimal Broth (SOB)

-Triptona	2 % (m/v)
-Extracto de levadura	0,5 % (m/v)
-NaCl	10 mM
-KCl	2,5 mM
-$MgSO_4$	10 mM
-$MgCl_2$	10 mM

Se ajustó a pH 7,5 con NaOH y se llevó a 1L con agua miliQ. Se esterilizó por autoclave.

SOC

Corresponde al medio SOB suplementado con 10 mM de glucosa, previamente esterilizada por filtración con filtro de 0,45 mm.

Inoue

-$MnCl_2.4H_2O$	55 mM
-$CaCl_2.2H_2O$	15 mM
-KCl	250 mM
-PIPES (0,5 M pH 6,7)	10 mM

Se llevó a volumen final con agua y se esterilizó por filtrado mediante filtro de 0,45 mm.

Pipes 0,5 M pH 6,7

Se disolvieron 15,1 gr de PIPES en 80 ml de H_2O.

Solución de resuspensión P1

-Tris.HCl pH 8	50 mM
-EDTA	10 mM

Se ajustó a pH 8 con HCl, se llevó a volumen final con agua miliQ y se agregó 100 µg/ml ARNasa antes de usar.

Solución de lisis P2

-NaOH	200 mM
-SDS	1%

Se llevó a volumen final con agua miliQ.

Solución de neutralización P3

-AcK 3M

Se ajustó a pH 5,5 con ácido acético glacial y se llevó a volumen final con agua miliQ.

Buffer TE

-Tris-HCl 10mM

-EDTA 0,1 mM

Se ajustó a pH 8 con HCl y se llevó a volumen con agua miliQ.

Buffer de equilibrio QBT

-NaCl 750 mM

-MOPS 50 mM

-Isopropanol 15 %

-Tritón X-100 0,15 %

Se ajustó a pH 7 con NaOH y se llevó a volumen final con agua miliQ.

Buffer de lavado QC

-NaCl 1 M

-MOPS 50 mM

-Isopropanol 15%

Se ajustó a pH 7 con NaOH y se llevó a volumen final con agua miliQ.

Buffer de elución QF

-NaCl 1,6 M

-Tris.HCl 50 mM

-Isopropanol 15 %

Se ajustó a pH 8,5 con HCl y se llevó a volumen final con agua miliQ.

Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 10X

-Tris base 890 mM

-EDTA-Na_2 20 mM

- Ácido bórico 890 mM

Se llevó a pH 8,3 y se ajustó a volumen final con agua miliQ. Al momento de usar se diluyó al 1X con agua miliQ.

Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X

-Tris base 2 M

-Ácido acético glacial 1 M

-EDTA 50 mM

El pH de la solución debe ser de 8,5. Se llevó a 1 litro con agua miliQ y al momento de usar se diluyó al 1X con agua miliQ.

Buffer de craqueo 5x

Tris-pH 6,8 250 mM

DTT 500 mM

SDS 10% (m/v)

Azul de Bromofenol 0,5%

Glicerol 50%

Al momento de usar se diluyó al 1x con agua miliQ.

Buffer de corrida para SDS-PAGE (10X)

-Glicina 1,92 M-

Tris base 250 mM

-SDS 1% (m/v)

Se ajustó a pH 8,3 y se llevó a 1 litro con agua miliQ

Buffer de transferencia 1x

-Tris base 25 mM

-Glicina 190 mM

-Metanol 20 %

Se ajustó a pH 8,3 y se llevó a 1 litro con agua miliQ.

Buffer de stripping

-SDS 2 %

-Tris pH 6,8 62,5 mM

-DTT 10 mM

Se ajustó a volumen con agua miliQ.

Citomix

-EDTA pH 7,6	2 mM
-KCl	120 mM
-$CaCl_2$	0,15 mM
-K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,6	10 mM
-HEPES	25 mM
-$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5 mM
-Glucosa	0,5 %
-BSA	100 µg/ml

Se llevó a pH 7,6 con KOH 1M y se llevó a volumen final con agua miliQ. Luego se esterilizó por filtrado.

Tablas

Primer	ID del gen	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido	Técnica
18S	Tb927.7.6881	5'-ACGGAATGGCACCACAAGAC-3'	5´-GTCCGTTGACGGAATCAACC-3'	qRT-PCR
TbRRM1	Tb927.2.4710	5'-CAATGGGACGTATGGGACAT-3'	5'-TCGTCTGTCACCACCCATAG-3'	qRT-PCR
RPL10A	Tb927.11.9710	5´-TGAAAGATCGCAAGGAGC-3´	5´-ACCAGAGAAACGCTTGTCC-3´	qRT-PCR
TbRRM1-XbaI/BamHI	-	-	5´-CGGTCTAGATGGATCCTCAGTCCC TTACGCGGT-3'	PCR
3xFLAG	-	5´-CCGAAGCTTACTAGTATGGAC TACAAAGACCATGACGG-3'	-	PCR

Tabla 1. Listado de primers utilizados.

	Anticuepos primarios utilizados		
Anticuerpo	**Especie**	**Dilución para Wesern blot**	**Dilución para IFI**
Suero anti TbRRM1	Ratón	1/1000	1/1000
Anti tubulina (Sigma)	Ratón	1/50000	-
Suero anti enolasa	Conejo	1/5000	-
Anti-FLAG (Sigma)	Ratón	1/5000	

Tabla 2. Listado de anticuerpos primarios utilizados.

	Anticuerpos secundarios utilizados		
Anticuerpo	**Especie**	**Dilución para Wesern blot**	**Dilución para IFI**
Anti-ratón IgG: Alexa 488 (Life Technology)	Ratón	-	1/1000
Anti-ratón IgG: HRP (Thermo Scientific)	Ratón	1/5000	-
Anti-conejo igG: HRP (Thermo Scientific)	Conejo	1/5000	-

Tabla 3. Listado de anticuerpos secundarios utilizados.