

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTA Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN

BIOLOGÍA MOLECULAR

CAPTURA Y AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS QUE SE UNEN AL ESPACIADOR

MENOR DEL LOCUS DE CALMODULINA DE *Trypanosoma cruzi*

LUIS ANGEL JAÉN

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

# HOJA DE APROBACIÓN

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
con especialización en Biología Molecular

Presentada por:

Luis Angel Jaén

Licenciado en Biología

Miembros del Jurado:

Dr. Franklyn Samudio

Dra. Magaly Sánchez de Chial

Dra. Ariel Magallón

Universidad de Panamá

Panamá, República de Panamá 2022

## DEDICATORIA

A Dios, mi madre Avelina Jaén y mi hermano Alexis Rivas. Gracias por todo su apoyo.

## AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer especialmente a mi asesor Dr. Franklyn Samudio por sus enseñanzas, asesoría, apoyo e inspiración a seguir estudiando.

Este trabajo fue realizado como parte del proyecto de investigación “Identificación de proteínas que se unen al espaciador del locus de calmodulina de *Trypanosoma cruzi*”, dentro de la Convocatoria Pública de Fomento a I+D (FID) 2017. financiado por la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT).

Agradezco al programa de Maestría en Ciencias Biológicas. En especial al grupo Docentes que impartieron clases.

Agradezco al Departamento de Parasitología del El Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud donde fue desarrollado todo el trabajo de laboratorio. Al Dr. Azael Saldaña y al Dr. José Calzada de igual forma al personal que de alguna a otra forma me apoyaron en el transcurso de esta experiencia.

De igual manera, a mis compañeras de maestría, fue un gusto compartir esta experiencia académica con ustedes

## ÍNDICE GEERAL

HOJA DE APROBACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE DE TABLA.....	viii
ÍNDICE DE FIGURA.....	viii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xii
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Enfermedad de Chagas.....	5
Epidemiología.....	5
Fases de la enfermedad.....	6
Triatominos.....	8
Vía de transmisión de la enfermedad de Chagas.....	9
Manifestaciones clínicas.....	11
Diagnóstico.....	13
Tratamientos.....	14
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	15
Fases evolutivas de <i>T. cruzi</i> .....	15
Ciclo biológico.....	16
Caracterización poblacional.....	17
Ultra estructura celular de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	18
Organización genómica.....	22
Expresión génica en tripanosomátidos.....	26
Regulación de la expresión génica en Tripanosomátidos.....	28
Regulación post-transcripcional.....	29
Trans-splicing.....	30
Poliadenilación.....	31
Degradación ARNm.....	32

Proteínas de unión al ARN en <i>T. cruzi</i> .....	33
Calmodulina.....	36
Rol de la calmodulina en las células en Tripanosomátidos.....	36
Loci de calmodulina en <i>T. cruzi</i> .....	36
CAPITULO III .....	38
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
Cultivo celular:.....	38
Extracción de DNA: .....	38
Amplificación del espaciador menor de calmodulina: .....	38
Clonación de los Productos Amplificados:.....	39
Secuenciación:.....	40
Detección de Proteínas que se unen al espaciador menor de calmodulina.....	40
Transcripción in vitro:.....	40
Extracto celular de <i>T. cruzi</i> .....	41
Captura de las proteínas que se unen al espaciador por RNA-Pull Down: .....	41
CAPITULO IV .....	42
RESULTADOS .....	42
Análisis in silico del transcripto sintético.....	42
PCR recursiva para insertar el aptámero en el espaciador menor de calmodulina.....	45
Detección de Proteínas que se unen al espaciador menor de calmodulina.....	47
Transcripción in vitro.....	47
Extracto celular de <i>T. cruzi</i> .....	49
Figura 21. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el perfil de proteínas de <i>T. cruzi</i> del extracto celular.....	50
Captura de las proteínas que se unen al espaciador por RNA-Pull Down: .....	50
CAPITULO V.....	54
DISCUSIÓN.....	54
CAPITULO IV .....	59
CONCLUSION.....	59
PERSPECTIVA.....	59
REFERENCIAS .....	60

## ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Cebadores utilizados en este estudio. ....	39
---	----

## ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Prevalencia mundial de la enfermedad de Chagas, 2017. ....	6
Figura 2. Fases de infección de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	7
Figura 3. Distribuciones espaciales de las principales especies de triatomíneos vectores de <i>T. cruzi</i> . ....	8
Figura 4. Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	15
Figura 5. Esquema del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> . ....	16
Figura 6. Distribución geográfica de las unidades discretas de tipificación de <i>Trypanosoma cruzi</i> en humanos. ....	18
Figura 7. Diagrama de las tres principales formas celulares que adopta <i>T. cruzi</i> (A: amastigote, B: epimastigote y C: tripomastigote) durante su ciclo de vida, cada una identificada con sus componentes celulares. ....	19
Figura 7. Compartimentalización del genoma de <i>T. cruzi</i> . (A) Estructura del genoma propuesta. (B) Porcentaje de GC por cada compartimiento para las cepas TCC y DM28c. ....	24
Figura 9. Variación alélica segmental en cromosomas diploides de <i>Trypanosoma cruzi</i> . ....	26
Figura 10. Genes expresados de manera diferencial entre las formas epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> . ....	27
Figura 11. Proceso de transcripción de <i>T. cruzi</i> . ....	28
Figura 12. Flujo general de la participación de las Proteína de unión a ARN (RBPs) en el metabolismo del mRNA. ....	35
Figura 13. Diagrama del locus de calmodulina de <i>T. cruzi</i> y frecuencia de las secuencias variantes de ARNm. ....	37
Figura 14. Estructura secundaria putativa del espaciador menor del locus de calmodulina estimado por el software Mfold. ....	44
Figura 15. Posición de inserción del Aptámero en la base 312 del espaciador de calmodulina estimada por el software Mfold. ....	45
Figura 16. Método utilizado para insertar Aptámero S1 en las bases 312 y 492 del espaciador menor de calmodulina mediante PCR recursiva. ....	46

Figura 17. Productos de PCR obtenidos por la PCR recursiva. ....	47
Figura 18. Productos obtenidos mediante transcripción in vitro. ....	48
Figura 20. Tratamiento con M-PER (ThermoFisher Scientific) y Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (ThermoFisher Scientific). ....	49
Figura 22. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar los resultados de Pull Down posterior a un lavado con el tampón de lavado de ARN. ....	51
Figura 23. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a dos lavados con el tapón de lavado de ARN. ....	52
Figura 24. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a tres lavados con el tapón de lavado de ARN. ....	52
Figura 25. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a cuatro lavados con el tapón de lavado de ARN. ....	53
Figura 26. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a cinco lavados con el tapón de lavado de ARN. ....	53
Figura 27. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a seis lavados con el tapón de lavado de ARN. ....	53
Figura 28. Resultados de la concentración de proteínas posterior al pull down con tres lavados de tapón de lavado ARN. ....	54

## LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
DCP2	Enzima 2 que elimina el ARN mensajero
DTU	Unidades de Tipificación discretas
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMLC	Espaciador menor del locus de calmodulina
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
k-DNA	ADN del cinetoplasto
LIT	Infusión de hígado y triptona
MASPs	Proteínas de superficie asociadas a mucina
MCD	Miocardiopatía dilatada
MND	Degradación del ARN mensajero mediada por mutaciones terminadoras
NSD	Decaimiento continuo
NUDT16	Nudix hidrolasa 16
PAN2 y PAN3	Subunidad del complejo de deadenilación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RBP	Proteínas de unión al ARN
RHS	Proteína de punto caliente de retrotransposón
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBE	Tris, borato y EDTA
UPF1	Regulador de transcripciones sin sentido 1
UTR	Región no traducida
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Xrn1	Enzimas hidrolíticas 5'-3'
ZFP	Proteínas dedo de zinc
dSSR	Regiones de cambio de cadena divergente
cSSR	Regiones de cambio de cadena convergente

## RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* es el parásito protozoario causante de la enfermedad de Chagas, una enfermedad endémica en Panamá. En este parásito, el proceso de regulación de la expresión génica es principalmente un proceso postranscripcional. Se ha sugerido que las proteínas de unión al ARN (RBP) tienen un papel clave en esta regulación génica. La calmodulina es una proteína censora de calcio altamente conservada, codificada por tres genes separados por dos espaciadores intergénicos (espaciador mayor y menor). El estudio de las bases moleculares que llevaron a las interacciones ARN-proteínas en *T. cruzi* podría contribuir a comprender la biología del parásito y desarrollar estrategias novedosas para el control de la enfermedad de Chagas. En este estudio desarrollamos una estrategia basada en una reacción en cadena de polimerasa (PCR) recursiva para insertar un aptámero de alta afinidad de estreptavidina en la secuencia del espaciador menor, para utilizarlo en una metodología de captura de proteínas. La secuencia completa del locus de calmodulina se descargó de GenBank (AAHK01001263.1). La secuencia del aptámero S1 (83 pb) reportada en publicaciones anteriores se manipuló para el diseño de los cebadores. Las secuencias se editaron con el software bioinformático UGENE. La secuencia del espaciador menor del locus de calmodulina (EMLC) se fragmentó en dos regiones. Los cebadores se diseñaron para flanquear las dos regiones, cada uno con los oligonucleótidos internos directo / inverso unidos a secuencias de medio aptámero. La PCR recursiva final pudo amplificar el espaciador menor de calmodulina incorporando el aptámero. Posteriormente realizamos una transcripción *in vitro* del producto amplificado y este transcrito fue utilizado para el desarrollo de la metodología *pull down*. Los resultados de nuestro ensayo de captura se visualizaron mediante electroforesis de proteína SDS page, evidenciando la presencia de proteínas afines al transcrito del espaciador menor de calmodulina. La metodología *pull down* desarrollada en este estudio representa una herramienta útil para capturar proteínas que interactúan con motivos de ARN.

## SUMMARY

*Trypanosoma cruzi* is the protozoan parasite that causes Chagas disease, an endemic disease in Panama. In this parasite, the regulation of gene expression is mainly a post-transcriptional process. It has been suggested that RNA-binding proteins play a key role in gene regulation. Calmodulin is a highly conserved calcium-sensitive protein encoded by three genes separated by two intergenic spacers (major and minor spacer). The study of the molecular basis leading to RNA-protein interactions in *T. cruzi* could contribute to understanding the biology of the parasite, leading to the development of new strategies for the control of Chagas disease. We developed a recursive PCR-based strategy to insert a high-affinity streptavidin aptamer into the minor spacer sequence for use in a protein capturing methodology. The complete sequence of the calmodulin locus was downloaded from GenBank (AAHK01001263.1). The sequence of the aptamer reported in previous publications (83 bp) was manipulated for primer design. The sequences were edited with UGENE bioinformatics software. The sequence of the minor spacer of the calmodulin locus (EMLC) was fragmented into two regions. Primers were designed to flank the two regions, each with internal direct/reverse oligonucleotides linked to half-aptamer sequences. The final recursive PCR was able to amplify the minor calmodulin spacer incorporating the aptamer. We subsequently transcribed the amplified product, and this transcript was used for the development of the pull-down methodology. The results of our capture assay were visualized by SDS page protein electrophoresis, evidencing the presence of proteins related to the calmodulin minor spacer transcript. The *pull-down* methodology developed in this study represents a useful tool to capture proteins interacting with RNA molecules.

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una enfermedad desatendida en América latina, causada por el parásito cinetoplasto *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Se estima que ha infectado a 6-7 millones de personas, causando alrededor de 7500 muertes al año y dejando en riesgo a 70 millones de personas en Latinoamérica (Stuart *et al.*, 2008; Tzizik & Borchardt, 2018).

En la era posgenómica, la información genómica y transcriptómica podría utilizarse para descubrir nuevas proteínas diana o fármacos específicos de patógenos (Crowther *et al.*, 2010). Este es el caso de *T. cruzi* que tiene muchos genomas publicados de cepas híbridas y linajes particulares y al menos 186.461 secuencias de nucleótidos disponibles en el GenBank. Los genes que codifican proteínas en este parásito están organizados como una gran variedad de genes consecutivos a lo largo de su genoma que pueden estar o no relacionados funcionalmente (El-Sayed *et al.*, 2005). La múltiples copias de estos genes están separadas por espacios intergénicos que pueden mostrar diferencias en el tamaño y la composición de nucleótidos (El-Sayed *et al.*, 2005). La transcripción de estos genes la lleva a cabo la ARN polimerasa II, que genera un gran transcrito policistrónico que se asemeja al producido por los procariotas, con la diferencia de que los genes en el ARN precursor pueden no estar funcionalmente relacionados (De Gaudenzi *et al.*, 2011; El-Sayed *et al.*, 2005). A diferencia de otros organismos, no se han encontrado promotores de la ARN polimerasa II en *T. cruzi*, por lo que se cree que la regulación de la expresión génica es completamente postranscripcional (Clayton, 2002a; Sabalette *et al.*, 2019). Las evidencias recogidas durante los últimos años sugieren han sugerido el inicio de la transcripción preferentemente en regiones interpolicistrónicas ubicadas en regiones de cambio de cadena divergente (dSSR) y termina en regiones interpolicistrónicas ubicadas en regiones de cambio de cadena convergente (cSSR) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004; Martínez-Calvillo *et al.*, 2003; Siegel *et al.*, 2010)

El parásito circula en dos huéspedes, uno invertebrado (triatominos) y otro vertebrado (mamíferos) para completar su ciclo de vida (Bern *et al.*, 2007; Chagas, 1909). Esta alternancia de huéspedes lleva a *T. cruzi* a pasar por un proceso de diferenciación celular que produce etapas

específicas que lo ayudan a sobrellevar y sobrevivir a variaciones ambientales específicas (Onyekwelu, 2019). Para cumplir con esta plasticidad fenotípica, el parásito utiliza el control postranscripcional para modular la expresión génica de más de 12.000 genes. En este contexto, los cambios morfológicos van seguidos de un ajuste en la expresión genética que, en ausencia de promotores de la ARN polimerasa II, podría realizarse en puntos de control postranscripcionales específicos (Das *et al.*, 2017; Sabalette *et al.*, 2019).

Otros procesos biológicos específicos como la poliadenilación, la traducción, la degradación del ARN precursor y la degradación del ARNm podrían actuar como puntos de control transcripcionales específicos en el parásito (Clayton, 2014).

La mayoría de los estudios sobre proteínas de unión a ARN asociadas a la regulación de la expresión génica se han centrado en la identificación de proteínas que se unen a regiones no traducidas (UTR) de genes de tripanosomátidos (Cassola & Frasch, 2009; Romaniuk, 2016; Ruiz *et al.*, 2018). Los motivos reguladores que se encuentran en las UTR de *T. cruzi* interactúan con proteínas de unión a ARN específicas para decidir el destino final del ARNm y/o modular los niveles individuales de ARNm durante el ciclo de vida de *T. cruzi* (De Gaudenzi *et al.*, 2003). Hasta donde sabemos, no se han informado de proteínas de unión a ARN que interactúen con motivos específicos y el precursor de ARN policistrónico del ARNm de tripanosomátidos (D'Orso *et al.*, 2003). El estudio de la interacción ARN-proteína a este nivel podría arrojar luz sobre el mecanismo utilizado por el parásito para controlar la expresión génica de los genes que codifican proteínas esenciales en este punto de control transcripcional.

La calmodulina es una proteína altamente conservada que actúa como sensor de calcio controlando de esta manera muchos procesos intracelulares esenciales en el organismo eucariota (Cheung, 1980). No sorprende, por tanto, que una distorsión de la homeostasis del calcio celular debido a la falta de esta proteína provoque necrosis celular y apoptosis (Zhivotovsky & Orrenius, 2011). En *T. cruzi*, la calmodulina participa en procesos importantes como el transporte a través de la membrana plasmática, el crecimiento y la diferenciación celular, así como en procesos que median la señalización intracelular importante para la proliferación del parásito (Benaim *et al.*, 1991; De Souza, 2009). Los genes que codifican para esta proteína, al igual que otros genes esenciales de este parásito (El-Sayed *et al.*, 2005), están organizados en un arreglo en tándem

de copias de genes separadas por espaciadores intergénicos que muestran diferente tamaño y composición (Chung & Swindle, 1990).

El locus de calmodulina de *T. cruzi* en el clon CL-Brener comprende tres copias del gen separadas por un espaciador mayor de 1338 pb y uno menor de 702 pb (Samudio & Brandão, 2018). Este estudio proporcionará información importante y novedosa en cuanto a la metodología desarrollada, demostrando la capturar de proteínas de unión a ARN específicas que interactúan con el motivo ubicado en el mRNA policistrónico del espaciador menor del locus de calmodulina.

### **Justificación**

Los estudios de ciencia básica enfocados en dilucidar aspectos genómicos y proteómicos de parásitos son escasos en el país. En particular se requieren estudios que busquen determinar los elementos de secuencia y sus respectivos ligantes en los espaciadores intergénicos entre las copias de genes esenciales de *T. cruzi*. Esto justifica el desarrollo de nuestro estudio utilizando como modelo el espaciador menor del locus de calmodulina. El análisis del espaciador menor del gen de calmodulina generará información sobre los tipos de elementos estructurales o motivos de secuencias y sus respectivos ligantes, posibles formas de regulación genética resultado de la interacción de estos elementos y blancos potenciales para el desarrollo de terapias basadas en el silenciamiento genético de genes esenciales.

### **Objetivos Generales y Específicos:**

Objetivo general: Establecer un método de captura y aislamiento de proteínas ligantes que se unen a elementos de secuencias del espaciador menor del locus de calmodulina de *T. cruzi*.

Objetivos específicos:

- Amplificar el espaciador menor del locus de calmodulina de *T. cruzi*.
- Insertar el aptámero S1 en la secuencia del espaciador menor del locus de calmodulina
- Desarrollar una metodología para realizar la transcripción *in vitro* del espaciador menor de calmodulina de *T. cruzi*.

- Desarrollar un método de captura de proteínas en columnas de estreptavidina utilizando un aptámero de alta afinidad por la estreptavidina.
- Capturar y aislar proteínas que se ligan al espaciador menor de calmodulina mediante una metodología de Pull-Down.

**Hipótesis de Trabajo:**

Existen proteínas afines a la región intergénica menor del locus de calmodulina.

Hipótesis Nula:

No existen proteínas de ligación al espaciador menor de calmodulina

## CAPITULO II

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también llamada Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Este parásito es transmitido a los huéspedes vertebrados por un insecto hematófago del grupo de los triatominos. La enfermedad de Chagas también puede transmitirse a través de transfusiones de sangre, de madres a hijos durante el embarazo, o con menos frecuencia, a través de trasplantes de órganos o alimentos contaminados. El parásito se reproduce en los tejidos internos y causa problemas en el corazón, el esófago., el colon y el sistema nervioso (Sanchez-Sancho *et al.*, 2010).

#### Epidemiología

Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, el parásito causante de la enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces y orina de insectos triatominos (vía vectorial) conocidos como vinchucas, chinches o con muchos otros nombres, según la zona geográfica (WHO, 2020).

Alrededor de 13% de la población de América Latina está en riesgo de infección por *T. cruzi* debido a la existencia de infestación domiciliar o transmisión activa de la infección. Países con el mayor porcentaje de población en situación de riesgo son: Ecuador (28,99%), Guyana Francesa, Guyana y Surinam juntos (25,12%), México (20,87%), Paraguay (19,65%), Honduras (14,66%), El Salvador (14,65%), Brasil (13,35%), Panamá (13,12%) y Nicaragua (11,47%). En Uruguay y Chile, donde la transmisión por el vector principal fue interrumpida en 1997 y 1999, respectivamente, y donde no hay vector secundario de importancia epidemiológica, el riesgo de transmisión fue de cero (WHO, 2015).

En la figura 1 podemos observar la prevalencia de la enfermedad de Chagas según los datos obtenidos del Global Burden of Disease (Hotez *et al.*, 2020). Un 30% de los enfermos con

enfermedad crónica presentan alteraciones cardiacas y un 10% padecen alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas (WHO, 2015)

En Panamá la enfermedad de Chagas se considera endémica en todo el territorio nacional, con marcado predominio en las comunidades rurales cercanas al Canal de Panamá donde también se reportan altas densidades del principal chinche vector (*Rhodnius pallescens*). Sin embargo, la gran dispersión territorial de vectores de menor importancia como *Panstrongilus geniculatus*, hace posible la transmisión en muchas áreas consideradas “no endémicas”(MINSA, 2012).

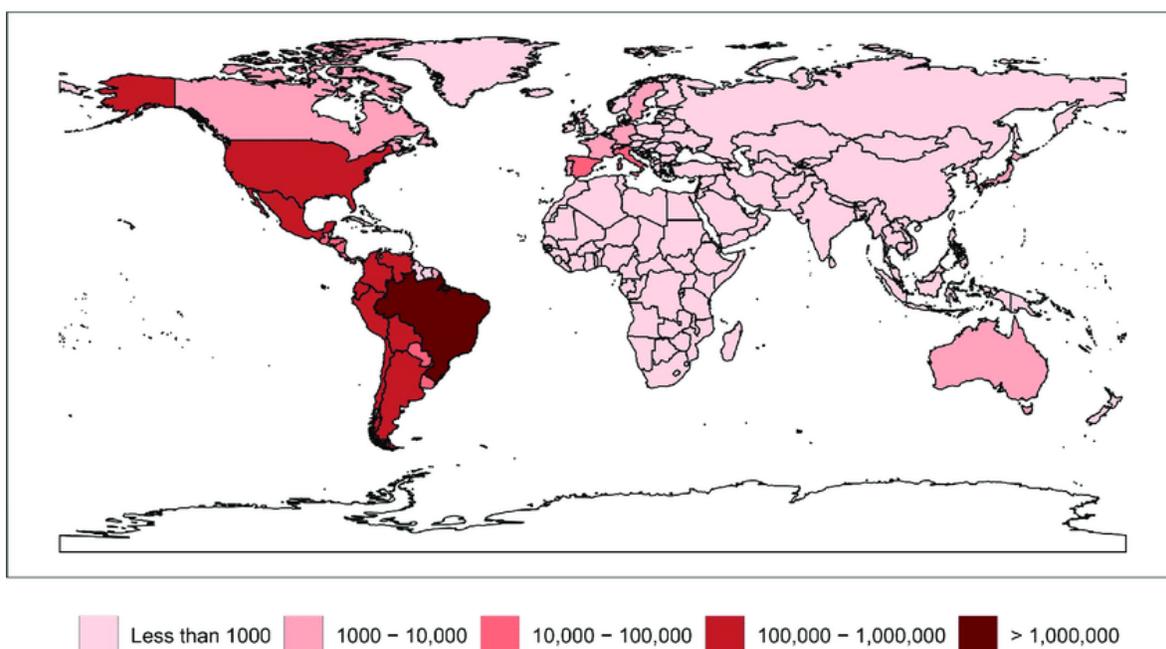


Figura 1. Prevalencia mundial de la enfermedad de Chagas, 2017. Fuente: (Hotez *et al.*, 2020).

### Fases de la enfermedad

El período de incubación después de la transmisión por vectores dura entre 1 a 2 semanas (Rassi *et al.*, 2010). La fase aguda de la infección por *T. cruzi* se caracteriza por una parasitemia detectable microscópicamente y dura de 4 a 8 semanas. El diagnóstico durante la fase crónica de la infección se basa en ensayos serológicos. Se considera que las personas con infección crónica por *T. cruzi*, pero con o sin síntomas de la enfermedad de Chagas tienen la forma indeterminada de la enfermedad. (Bern, 2011). Figura 3.

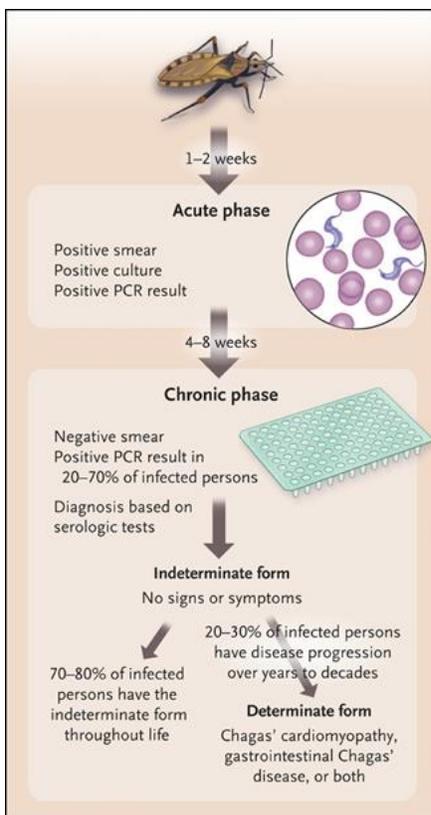


Figura 2. Fases de infección de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: (Bern *et al.*, 2011).

La característica distintiva de la fase aguda es la parasitemia detectable al microscopio. Los síntomas suelen ser leves e inespecíficos e incluyen fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica. En casos raros, un nódulo cutáneo (chagoma) o un edema palpebral prolongado indoloro (signo de Romaña) pueden indicar el lugar de la inoculación. La gran mayoría de las infecciones agudas nunca se detectan. En menos del 1% de las infecciones, la fase aguda es grave y potencialmente mortal debido a la meningoencefalitis o miocarditis (Bern *et al.*, 2011). El individuo que sobreviven a la fase aguda, la respuesta inmunitaria mediada por células controla la replicación del parásito, los síntomas desaparecen espontáneamente y la parasitemia disminuye en 4 a 8 semanas (Rassi & Marcondes de Rezende, 2012). Las personas que pasan a la fase crónica de la infección por *T. cruzi*. permanecen en su mayoría asintomáticas, pero con la infección de por vida. Se estima que entre el 20 y el 30% de las mismas progresan en el transcurso de años hacia la miocardiopatía de Chagas crónica (Rassi *et al.*, 2009; Rassi & Marcondes de Rezende, 2012).

## Triatominos

La transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas se da por insectos triatominos, los cuales en función de su reservorio pueden desarrollar diferentes formas de transmisión: zoonótica, antroponótica o zooantroponótica (Coura *et al.*, 2002). Estos triatominos responsables de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae y comprenden un total de 136 especies divididas en 18 géneros y 6 tribus (Jurberg 2006; Lent & Wygodzinsky, 1979). Sin embargo, sólo unos pocos géneros están implicados en la transmisión humana del parásito, siendo *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* los más importantes desde un punto de vista epidemiológico (Dujardin *et al.*, 2002). Los vectores de mayor importancia en América se presentan en la figura 2.

En la República de Panamá se han identificado 10 especies de chinches vectores de Chagas, las más relevantes desde un punto de vista epidemiológico en orden serían: *Rhodnius pallescens*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus geniculatus*, *Eratyrus cuspidatus* y *Triatoma dispar*. Se les conoce con el nombre común de “chinche mamón”, “chinche besador” o “chinche de Chagas”(MINSA, 2012).

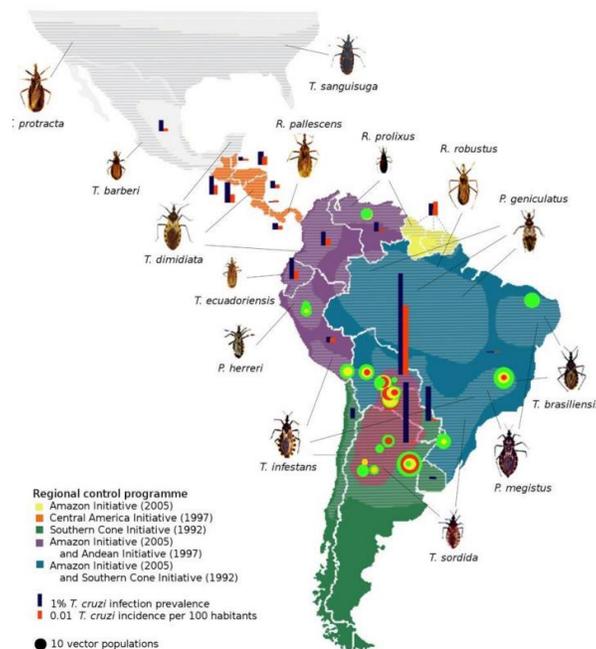


Figura 3. Distribuciones espaciales de las principales especies de triatominos vectores de *T. cruzi*. Los países endémicos para la enfermedad de Chagas están coloreados según su

contribución a los principales programas regionales de control iniciados en los años 1990-2000. Los círculos verdes, amarillos y rojos representan poblaciones de triatomíneos susceptibles, resistentes y altamente resistentes. Los tamaños de los círculos son proporcionales al número de poblaciones de cada provincia donde se ha detectado resistencia a uno o más insecticidas. Fuente: (Flores-Ferrer *et al.*, 2018).

### **Vía de transmisión de la enfermedad de Chagas**

La principal forma de transmisión de *T. cruzi* es la vía vectorial (WHO, 2012). Otras formas de transmisión se dan a través de transfusiones de sangre, donaciones de órganos y por vía congénita, estos son motivo de preocupación en regiones no endémicas (Bern *et al.*, 2011). La transmisión oral se ha reconocido recientemente como la causa de pequeños brotes esporádicos, principalmente en la región amazónica (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). También se han informado casos accidentales de transmisión en laboratorio (Herwaldt, 2001).

Transmisión por el vector: Se da principalmente en áreas endémicas, a partir de insectos triatomíneos, de la familia Reduviidae (en la mayoría de los casos, pertenecientes al género *Triatoma*), los cuales tienen su ecosistema natural en el continente americano; estos insectos son conocidos comúnmente como “vinchuca”, “chipo”, “chiribico”, “chinche besucona” o “barbeiro”, entre otros (Roca *et al.*, 2015). Estos vectores pican en zonas expuestas de la piel, como la cara y luego defeca cerca de la picadura, posteriormente los parásitos penetran en el organismo cuando la persona se frota instintivamente empujando las heces al lugar de la picadura, hacia los ojos, la boca o alguna herida (WHO, 2015).

Transmisión por transfusiones: La transmisión por transfusiones de sangre es el segundo modo de transmisión más frecuente. Su riesgo radica en que puede extenderse más allá de las áreas endémicas, debido a la migración de latinoamericanos hacia países de Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía. Aunque se desconocen las cifras concretas, en los países europeos se estima que alrededor del 2 % de los inmigrantes latinos están infectados con *T. cruzi* y que podrían actuar como donadores de sangre (Gascon *et al.*, 2010). En Estados Unidos, se han documentado cinco casos de infección por *T. cruzi* asociados a transfusiones de sangre desde la década de los ochenta, y entre 2006 y 2011 se reportaron 1.459 donaciones seropositivas para *T. cruzi* (Bern *et al.*, 2011). Casi todos los países endémicos de América Latina cuentan con una legislación

que regula el tamizaje de sangre para transfusiones, y la prevalencia de la infección por *T. cruzi* lo que ayuda a disminuir la transmisión en gran parte de la región (Dias & Schofield, 1998). En la República de Panamá el tamizaje de enfermedades que pueden transmitirse por transfusiones de sangre o derivados sanguíneos es obligatorio, de acuerdo a la Resolución No. 374 del 7 de septiembre de 2001, en la cual se obliga de igual manera a los Bancos de Sangre existentes en la República de Panamá a confirmar los casos positivos en el Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública del Ministerio de Salud (MINSAL, 2001).

Transmisión por donación de órganos: Los receptores no infectados que reciben un órgano de un donante infectado por *T. cruzi* pueden desarrollar una infección aguda. Sin embargo, la transmisión no se da en el 100% de los trasplantes; en una serie de 16 receptores no infectados de riñones de donantes infectados, solo 3 (19%) adquirieron la infección por *T. cruzi* (Riarte *et al.*, 1999). En la literatura se han documentado diecinueve casos de transmisión por trasplante de órganos (13 trasplantes de riñón, 1 de riñón y páncreas, 3 de hígado y 2 de corazón) (Barcán *et al.*, 2005; Ferraz & Figueiredo, 1993; Figueiredo *et al.*, 1990; Kun *et al.*, 2009; Souza *et al.*, 2008). Se cree que el riesgo de un trasplante de corazón es mayor que el de un trasplante de riñón o hígado (Chin-Hong *et al.*, 2011).

Transmisión congénita: Este tipo de transmisión ocurre cuando las mujeres infectadas transmiten el parásito a su descendencia, manteniendo así la enfermedad en ausencia del vector (Schenone *et al.*, 2001). Entre 1 y 10% de los hijos de madres infectadas por *T. cruzi* nacen con la enfermedad de Chagas congénita (Azogue & Darras, 1991; Hermann *et al.*, 2004). Los factores que aumentan el riesgo que los hijos puedan contraer la infección por vía congénita son: un mayor nivel de parasitemia materna, baja respuesta inmunitaria anti-*T. cruzi*, madres adolescentes, VIH y, cepa del parásito (Andrade, 1982; Bern *et al.*, 2009; Freilij & Altcheh, 1995; Torrico *et al.*, 2004).

Vía oral: La vía transmisión oral es también vector dependiente, es necesaria la ingesta de las heces contaminadas del triatomino para que se produzca la infección por esta vía. Se considera una vía de transmisión de importancia en la región Amazónica (Toso *et al.*, 2011). La presentación clínica de la enfermedad de Chagas contraída por transmisión oral es diferente a la observada con las formas tradicionales de infección. Así, después de una latencia de 5 días post-ingesta, se expresa con una manifestación aguda, como resultado de la cual los pacientes

desarrollan una miocarditis grave. El cuadro es de alta mortalidad, presentando peor pronóstico mientras menor sea la edad del paciente (Barbosa, 2006).

### **Manifestaciones clínicas**

La enfermedad de Chagas se manifiesta en una fase aguda o inicial, seguida de una fase crónica que se puede categorizar en formas indeterminadas, cardíacas o digestivas con diferentes manifestaciones clínicas (Prata A., 2001). La enfermedad aguda grave ocurre en menos del 1% de los pacientes, y las manifestaciones clínicas incluyen miocarditis aguda, derrame pericárdico y/o meningoencefalitis (Bern *et al.*, 2011; Prata, 2001). La incidencia de infección aguda ha disminuido marcadamente desde la utilización de métodos para el control de la transmisión vectorial y transfusiones de sangre en la mayoría de los países de América Latina. La enfermedad de Chagas aguda también puede ocurrir debido a la transmisión de *T. cruzi* por trasplante de órganos o la reactivación de una infección crónica relacionada con el estado inmunocomprometido del paciente (Bern, 2012). Una vez que pasa la fase aguda, los pacientes entran en una fase indeterminada de la enfermedad que se caracteriza por la presencia de una infección y se confirma mediante pruebas serológicas o parasitológicas, un electrocardiograma, exámenes radiológicos de tórax, esófago y colon (Marin-Neto *et al.*, 2002; Ribeiro & Rocha, 1998). En otro sistema de clasificación, se ha informado que los pacientes en esta etapa tienen enfermedad de Chagas crónica sin patología detectable (Mitelman, 2011). La mayoría de las personas infectadas en áreas endémicas se encuentran en esta etapa de la enfermedad, y aproximadamente el 40% de estos pacientes pueden durar durante años en esta condición clínica (Dias, 1989). Sin embargo, la mayoría de estos pacientes evolucionan de una forma indeterminada a una crónica, y se desarrollan nuevas anomalías en el electrocardiograma o evidencia de cardiopatía definitiva en el 1,8-5% de los pacientes cada año (Dias, 1989; Ribeiro & Rocha, 1998; Sabino *et al.*, 2013).

Los pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad tienen un pronóstico excelente y su esperanza de vida es similar a la de las personas sin enfermedad coronaria (Dias & Schofield, 1998; Marin-Neto *et al.*, 2002; Ribeiro & Rocha, 1998). Sin embargo, algunos de estos pacientes presentan resultados fuera de los límites de referencias cuando se les realizan exámenes cardíacos no invasivos (Marin-Neto *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2001; Ribeiro & Rocha, 1998; Rochitte *et al.*, 2005). En general, un tercio de estos pacientes desarrollarán una enfermedad

coronaria crónica dos décadas después de la infección inicial (Coura & Borges-Pereira, 2010; Prata, 2001). Esta fase clínica está relacionada con la afectación patológica de órganos específicos, particularmente el corazón, el esófago o el colon, que se agrupan en tres formas principales de la enfermedad: cardíaca, digestiva o cardiodigestiva (Coura & Borges-Pereira, 2010; Rassi *et al.*, 2010). La cardiopatía es el aspecto clínico más importante de la enfermedad de Chagas debido a su frecuencia y gravedad. La fase crónica dura toda la vida y da como resultado una tasa de supervivencia más corta de la normal (Nunes *et al.*, 2011; Rassi *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2012). El daño miocárdico en la cardiopatía chagásica es generalmente un proceso progresivo que se puede clasificar en estadios (A, B, C y D), según las recomendaciones internacionales adaptadas a la enfermedad de Chagas (Andrade *et al.*, 2011). Se considera que aquellos pacientes con un electrocardiograma normal tienen la fase indeterminada de la enfermedad (etapa A). La aparición de anomalías en el electrocardiograma implica progresión de la enfermedad (estadio B) y precede a la aparición de síntomas de insuficiencia cardíaca (estadios C y D). La muerte súbita puede interrumpir este curso en cualquier momento, incluso antes del desarrollo de los síntomas (en la etapa A o B), y la muerte puede ocurrir debido a una insuficiencia cardíaca progresiva o un accidente cerebrovascular. Las manifestaciones más tempranas de la cardiopatía chagásica suelen ser anomalías del sistema de conducción, con mayor frecuencia bloqueo de rama derecha o bloqueo fascicular anterior izquierdo (Maguire *et al.*, 1987; Ribeiro *et al.*, 2013), anomalías segmentarias del movimiento de la pared del ventrículo izquierdo (Pazin-Filho *et al.*, 2006) y difusión disatolítica (Barros *et al.*, 2001; Garcia-Alvarez *et al.*, 2010).

La miocardiopatía dilatada es la forma más grave de la fase crónica de la enfermedad de Chagas con una alta mortalidad (Nunes *et al.*, 2011; Rassi *et al.*, 2007). Puede manifestarse por disfunción ventricular con insuficiencia cardíaca, arritmias, bloqueos cardíacos, muerte súbita y eventos tromboembólicos (Coura & Borges-Pereira, 2010; Ribeiro *et al.*, 2012). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas varían según el grado de daño miocárdico. La manifestación leve puede ocurrir sin disfunción ventricular izquierda y con frecuencia se caracteriza solo por la presencia de anomalías asintomáticas en el electrocardiograma (Prata, 2001). La miocardiopatía dilatada con insuficiencia cardíaca suele ser una manifestación tardía de la cardiopatía chagásica (Acquatella, 2007).

## **Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas incluye técnicas de tipo parasitológico, serológico y moleculares (Berrizbeitia, 2013). Debido a los diferentes estadios del parásito durante la infección en el hospedero, donde el parásito expresa antígenos diferentes (Escalante *et al.*, 2014), por lo que la prueba para la detección de la infección depende de la etapa clínica que atraviesa el paciente (García, 2011). En la fase aguda de la enfermedad las pruebas parasitológicas son las adecuadas para detectar la presencia del parásito en sangre por la presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* circulantes (Escalante *et al.*, 2014; Roca *et al.*, 2015). Mientras que, en la fase crónica, existe baja cantidad o ausencia de parásitos circulantes, pero producen altos niveles de anticuerpos; por ende, las pruebas a realizar son del tipo inmunológicas, que buscan la detección de anticuerpos IgG anti- *T. cruzi*; pues, son indicativas de haber tenido contacto con el parásito (Alvarez *et al.*, 2014; Brasil *et al.*, 2010; Riera *et al.*, 2012).

**Diagnóstico serológico:** El diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas se realiza por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (Zulantay *et al.*, 2007). Estas técnicas presentan una alta sensibilidad (95- 100%), pero no permiten determinar la etapa de la infección ni la evolución clínica, tampoco permiten realizar estudios de evaluación de eficacia quimioterapéutica a causa que el paciente permanecen persistentemente positivo en el tiempo, aun cuando las pruebas parasitológicas resulten negativas (Rassi *et al.*, 2010; Sosa-Estani *et al.*, 2009).

**Diagnóstico parasitológico directo:** El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas está basado en la demostración de la presencia de *T. cruzi* mediante pruebas directas, aplicadas fundamentalmente en el período agudo de la infección. Los métodos de elección son: examen microscópico de sangre fresca, método Strout para concentrar parásitos, microhematocrito, hemocultivo y xenodiagnóstico (Britto, 2009). En el período crónico de la enfermedad, la parasitemia disminuye a niveles bajos y la utilidad de las pruebas directas se ve limitada, siendo los métodos serológicos los de elección en esta etapa, aquellos que detectan anticuerpos específicos contra el parásito, especialmente de tipo IgG (Rassi *et al.*, 2010).

**Diagnóstico parasitológico molecular:** En la última década, la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) ha sido introducida como método diagnóstico parasitológico de elección en las diferentes etapas de la enfermedad de Chagas, permitiendo no solamente reconocer la presencia de *T. cruzi* en sangre, casos congénitos o evaluación de la eficiencia quimioterapéutica, sino también caracterizar las cepas circulantes de *T. cruzi* en vectores y mamíferos (Schijman *et al.*, 2011; Zulantay *et al.*, 2011).

## **Tratamientos**

El tratamiento de la enfermedad de Chagas abarca tanto la terapia específica para parásitos como la terapia para el manejo de la insuficiencia cardíaca. La terapia antiparasitaria está indicada para pacientes con infección aguda, en niños y personas recientemente infectadas, como en aquellos con forma congénita de la enfermedad de Chagas y en reactivación de pacientes inmunocomprometidos (Andrade *et al.*, 2011). Los fármacos disponibles desde hace 50 años para el tratamiento parasitario de la enfermedad son: el nifurtimox y benznidazol (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988; Ohnishi *et al.*, 1983). Estos actúan sobre el genoma de *T. cruzi*, inhibiendo la síntesis de ADN, ARN y de proteínas, degradando estas moléculas, reduciendo la parasitemia (Goijman & Stoppani, 1985; Gonzalez & Cazzulo, 1989; Gugliotta *et al.*, 1980). Pero estos fármacos tienen una eficacia limitada en la fase crónica de la enfermedad (Morillo *et al.*, 2015). Aunque son los únicos fármacos autorizados internacionalmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, originan efectos secundarios por lo que no se recomiendan para personas con trastornos neurológicos, psiquiátricos, embarazadas y pacientes con insuficiencia renal (Patterson & Wyllie, 2014), también se ha demostrado que su eficacia es variable (Ribeiro *et al.*, 2009). A pesar de sus efectos secundarios y de la existencia de cepas parasitarias naturalmente resistentes a ambos compuestos, la principal limitación del nifurtimox y benznidazol es su insuficiente actividad antiparasitaria en la forma crónica de la enfermedad debido a que aproximadamente  $\geq 80\%$  de los pacientes crónicos tratados no se curan parasitológicamente (Cançado, 2002; Urbina, 2009). Pese a esto, es de suma importancia tratar a los individuos con enfermedad de Chagas crónica que cursan el período indeterminado, puesto que al hacerlo, se evita el desarrollo de cardiopatía, que es evolutiva y por lo general de mal pronóstico (Rassi *et al.*, 2009).

## ***Trypanosoma cruzi***

*T. cruzi* pertenece al Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Matisgophora, Clase Zoomastigophorea, Orden Kinetoplastida (Rassi & Marcondes de Rezende, 2012). Caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria (Momen, 1999). Genéticamente se divide en dos subgrupos altamente divergentes, linajes Tc1 y Tc2 (Campbell *et al.*, 2005), que incluyen todos los tipos de cepas aisladas tanto en humanos como en vectores y mamíferos silvestres, siendo el Tc2 el mayormente asociado a las formas crónicas de la enfermedad (Briones *et al.*, 1999).

### **Fases evolutivas de *T. cruzi***

*T. cruzi* presenta tres formas morfológicas las cuales son: amastigote, epimastigote y tripomastigote (Garcia *et al.*, 2010) (Figura 4). Las mismas se clasifican en dos estadios, replicativo no infectivo y replicativo infectivo (Bern, 2011) (Figura 1). La forma amastigote corresponde a células esféricas, sin flagelo visible, que se localizan dentro de células de mamíferos donde se replican. La forma epimastigote es alargada, flagelada y presenta el kinetoplasto anterior al núcleo; son extracelulares y se localizan únicamente dentro del tracto digestivo de los triatominos donde se replican. Por último, la forma tripomastigote también presentan un cuerpo alargado y flagelo pero, a diferencia del epimastigote, el kinetoplasto se localiza posterior al núcleo, se encuentran extracelularmente en el tracto digestivo del insecto y en diferentes tejidos en el mamífero, siendo una forma no replicativa (Kollien & Schaub, 2000).

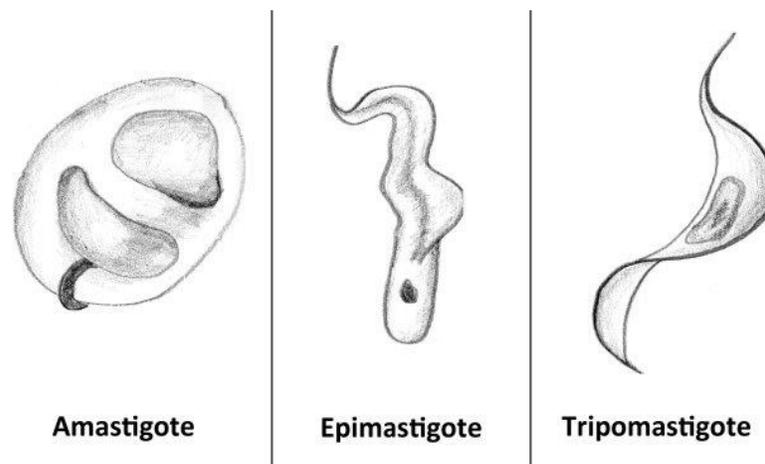


Figura 4. Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: (Toso *et al.*, 2011)

## Ciclo biológico

El ciclo biológico (figura 5) inicia cuando el insecto vector se alimenta de la sangre del hospedero infectado. Al ser ingeridos los tripomastigotes sanguíneos se transforman irreversiblemente a epimastigotes, que se dividen mediante fisión binaria longitudinal, y luego de unos pocos días viajan hasta la porción distal del intestino. En este se transforman a tripomastigotes metacíclicos, que son liberados del vector en las heces (Heyneman & Mc Kerrow, 1991; Kowalska *et al.*, 2009).

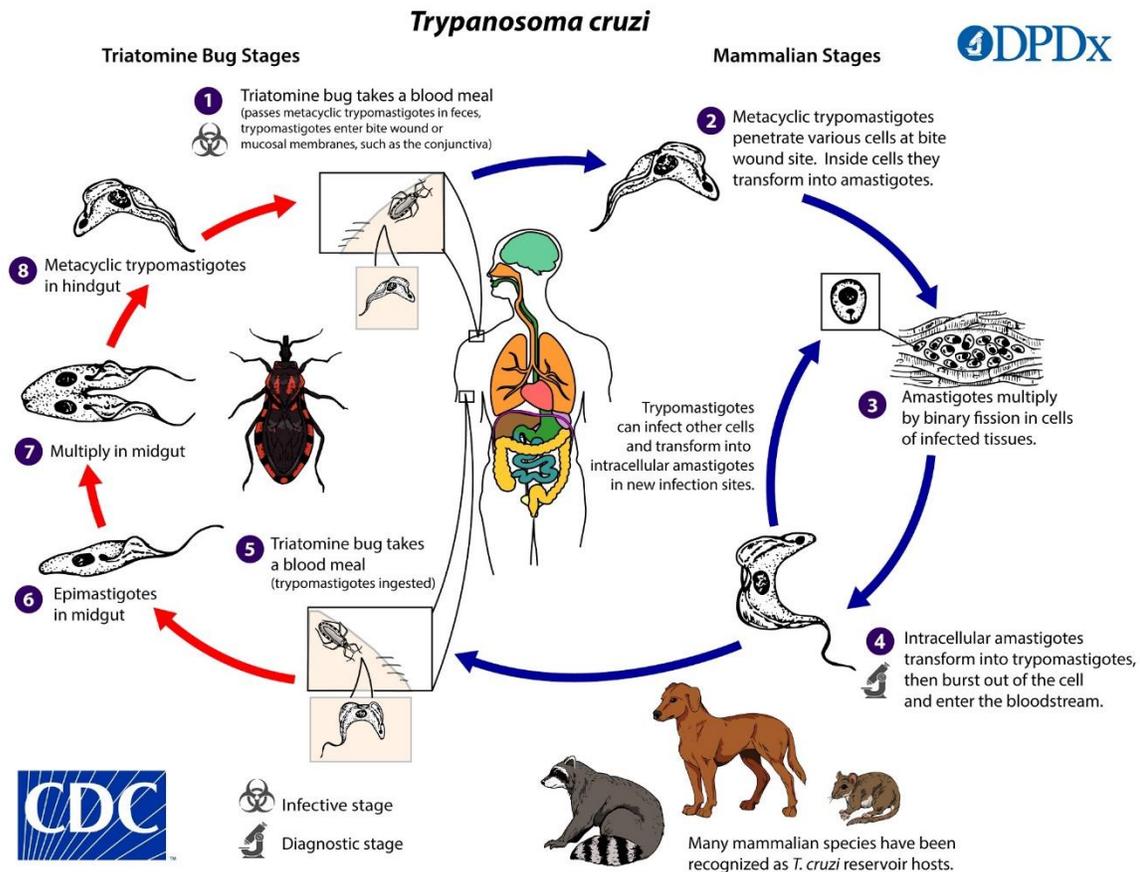


Figura 5. Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*. Fuente: CDC, 2021.

La defecación del chinche se produce en el momento de la picadura, mientras se alimenta, o muy poco después. Esto ocurre habitualmente de noche y ocasiona prurito (Tomlinson *et al.*, 1995). El hombre, picado en el transcurso del sueño, se auto infecta al transportar inconscientemente con los dedos las deyecciones parasitadas del insecto hasta la mucosa bucal,

nasal y ocular a través de las cuales penetran los parásitos, sin necesidad de tener excoriaciones, o hasta heridas de la piel o el propio sitio de la picadura que también puede ser contaminado (Bonay & Fresno, 1995; Krogstad, 1994). Dentro del hospedero los tripomastigotes metacíclicos penetran las células y se diferencian en amastigotes, los cuales pueden dividirse cada 12 horas por división binaria, provocando la destrucción y muerte de la célula infectada. Una vez liberados se transforman en tripomastigotes, algunos ingresan al torrente sanguíneo o infectan nuevas células (Brisse *et al.*, 2000; Romero, 2007). Esta etapa descrita coincide con la fase aguda de la enfermedad y es la que asegura la transmisión de la enfermedad por la elevada parasitemia, pues el vector toma el parásito de la sangre durante sus comidas. La aparición de los parásitos en la sangre ocurre aproximadamente después de 7 a 14 días de la infección (período prepatente). Todos los tejidos pueden ser invadidos pero los más afectados son aquellos ricos en células del sistema retículoendotelial, teniendo predilección por los macrófagos en primer lugar y le siguen en orden de frecuencia el tejido muscular cardíaco, muscular estriado, músculo liso y menos frecuentemente, por tejido nervioso (Luquetti, 1994).

### **Caracterización poblacional**

La especie de *T. cruzi* es una población heterogénea, donde existen diversas cepas con adaptabilidades biológicas diferentes, como capacidad infectante, virulencia, capacidad de replicación y diferenciación (López *et al.*, 1998), histotropismo, capacidad de inducir respuesta inmune (Espinoza *et al.*, 2010), adaptación a especies de vectores y reservorios (Sánchez *et al.*, 2006), susceptibilidad a compuestos (Martínez *et al.*, 2013), etc. Con la determinación de poblaciones de *T. cruzi* diferenciados genética y bioquímicamente se ha logrado unificar los diferentes genotipos existentes, la clasificación propuesta comprende siete DTU (*Discreet Typing Units*) de *T. cruzi* (TcI-TcVI y Tcbat) (Brenière *et al.*, 2016; Zingales *et al.*, 2009, 2012) Figura 6. las cuales explican mejor las relaciones filogenéticas entre las cepas. TcI y TcII son las más antiguas y divergentes. TcIII y TcIV muestran similitudes y es considerada como el resultado de un evento de hibridación entre TcI y TcII. TcV y TcIV, son generalmente aceptados como híbridos derivados de las cepas TcII y TcIII (Patterson & Guhl, 2010), y finalmente Tcbat que está asociado predominantemente en murciélagos (Lima *et al.*, 2015; Marcili *et al.*, 2009).

En Panamá se ha demostrado que el DTU predominante es el TcI, y en muchos casos asociada con la enfermedad (Brandao *et al.*, 2008; Saldaña *et al.*, 2018; Samudio *et al.*, 2007; Sousa *et*

al., 2006). Estudios reciente han validado la presencia del linaje dominante TcI en Panamá y a demostrado la presencia del linaje TcII y TcVI circulando en el país (Calzada *et al.*, 2022).

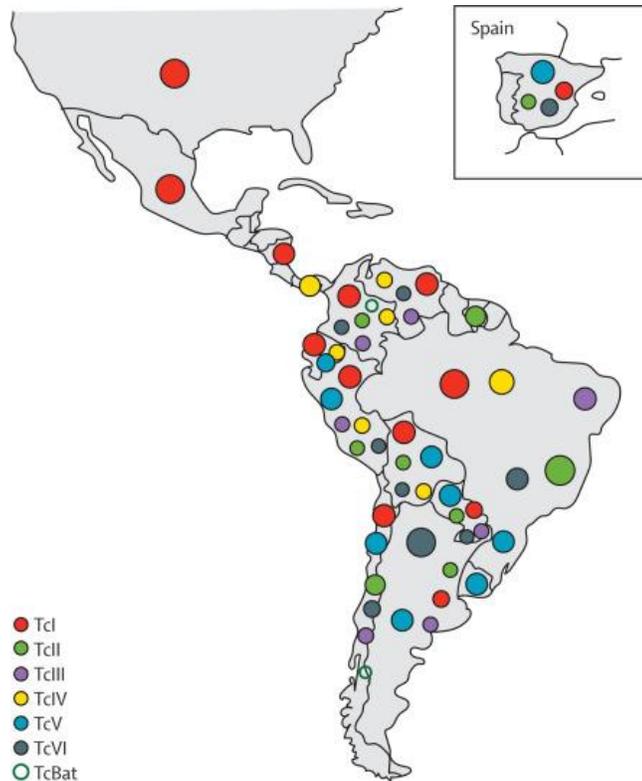


Figura 6. Distribución geográfica de las unidades discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* en humanos. El mapa muestra la prevalencia estimada de unidades de tipificación discreta (DTU) de *T. cruzi* humano en países endémicos y no endémicos para la enfermedad de Chagas (América del Norte, América Central, América del Sur y España). Los tamaños de los círculos reflejan la aparición relativa de DTU en un área determinada. Fuente: (Magalhães *et al.*, 2022).

### **Ultra estructura celular de *Trypanosoma cruzi***

La composición de la membrana celular juega un papel muy importante en los parásitos intracelulares, siendo clave en el proceso de infección que éstos desencadenan. Por ello es importante entender su organización estructural, composición y propiedades funcionales. La membrana celular de *T. cruzi* está formada por la bicapa lipídica y por una serie de componentes azucarados, como glicolípidos y glicoproteínas (mucinas, transialidasas, etc.) que son enfrentados al medio extracelular, constituyendo el glicocálix (De Souza, 2009). En la superficie

exterior se observa una cubierta celular desarrollado, tres veces más gruesa en los tripomastigotes que en los epimastigotes. También se describe la presencia de ácido siálico asociado a glicopéptidos, que juega un papel importante en la interacción *T. cruzi* con macrófagos (Martínez-Díaz *et al.*, 2001). En la cara interna de la membrana se observan numerosos microtúbulos que se extienden de un extremo al otro del flagelado (Dantas *et al.*, 2003). En el interior del citoplasma también podemos observar una serie de microtúbulos subpeliculares que recorre el interior del parásito denominados citoesqueleto. Los microtúbulos están asociados a monómeros acetilados y tirosinados, actina, proteínas derivadas de esta y miosina. En *T. cruzi*, a diferencia de otros eucariotas, se ha observado que la actina presenta importantes diferencias en su estructura tridimensional, lo que afectaría a sus interacciones con otras proteínas, y además esta se encuentra acumulada en estructuras puntuales y en la estructura flagelar (Rodrigues *et al.*, 2014; De Souza, 2009).

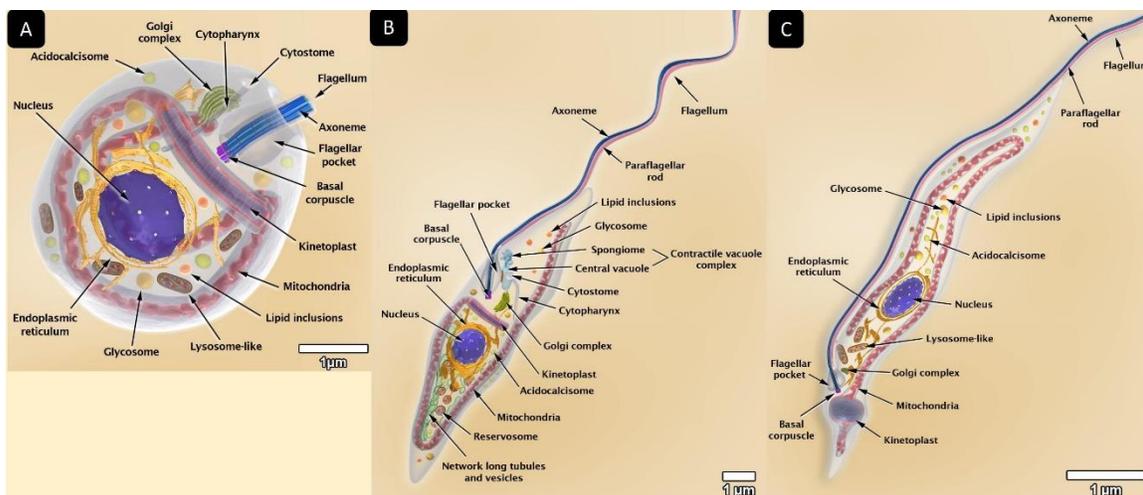


Figura 7. Diagrama de las tres principales formas celulares que adopta *T. cruzi* (A: amastigote, B: epimastigote y C: tripomastigote) durante su ciclo de vida, cada una identificada con sus componentes celulares. Adaptada de: (Teixeira *et al.*, 2012).

El citoplasma de *T. cruzi* presenta diferentes orgánulos ( figura 1 ), entre ellos:

- 1- La *mitocondria*: *T. cruzi* presenta una mitocondria única que se extiende a lo largo del cuerpo celular (Figura 4). La matriz mitocondrial posee una región especializada formada por ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial, denominado kinetoplasto, el cual puede llegar a representar hasta el 25% del ADN total del parásito.

Está formado por dos tipos de ADN circular, los maxi y mini círculos, concatenados entre sí, que se concentran cercanos al cuerpo basal. Existen 5000 minicírculos de aproximadamente 1 kb, y 25 maxicírculos cuyo tamaño ronda los 23 kb (Hoffmann *et al.*, 2016; Shapiro, 1995).

- 2- El cinetoplasto: estructura propia del orden Kinetoplastida, contiene altas concentraciones del ADN extranuclear, conocido como cinetoplástico o k-DNA. A diferencia de otros órdenes de eucariotas, que presentan aproximadamente alrededor del 1% del ADN celular en la mitocondria, *T. cruzi* puede concentrar entre el 16 y el 30% de su ADN total en el genoma mitocondrial (Dias & Macedo, 2005).
- 3- Los glucosomas: son estructuras esféricas o alargadas rodeadas por una membrana. Inicialmente, estos orgánulos se denominaron microcorpúsculos, en analogía con las estructuras que contienen la enzima catalasa que se encuentran en las células de los mamíferos y que más tarde se denominaron peroxisomas. Sin embargo, a diferencia de la estructura de las células de los mamíferos, la principal característica específica que da nombre a este orgánulo en los tripanosomátidos es la presencia de una mayoría de enzimas de glucólisis. Actualmente, los glucosomas se consideran un tipo especial de peroxisomas en los tripanosomátidos, debido a que en algunas especies también se demostró la presencia de catalasa en este orgánulo (Souza *et al.*, 2008).
- 4- Flagelo: surge de una invaginación llamada bolsillo flagelar, responsable de actividades endocíticas y exocíticas (Martins *et al.*, 2012). Además, se caracteriza por carecer de la subpelícula de microtúbulos y por tener una membrana de composición diferente a la plasmática (Souza *et al.*, 2009). En su interior, se puede encontrar un axonema similar al de otros seres vivos, con 9 pares de microtúbulos rodeando a una pareja de microtúbulos centrales. Sin embargo, a lo largo del axonema del flagelo de *T. cruzi* se asocian varios filamentos formando una estructura de enrejado llamada vara paraxial o paraflagelar de la que aún no se han caracterizado todos sus componentes pero que se sabe son vitales para la supervivencia del parásito (Souza *et al.*, 2009). Algunos estudios han determinado que la membrana flagelar se une al cuerpo celular del parásito en ciertas etapas de vida, y este, al moverse, crea una impresión visual de membrana ondulante (De Souza, 2002).

- 5- Los reservosomas: se describen como un grupo de estructuras monocapas redondeadas o irregulares que contienen varias inclusiones en su matriz. Se concentran en la región posterior de los parásitos y desaparecen durante la transformación de epimastogotes en tripomastigotes. Poseen proteasas y acumulan proteínas por endocitosis (Souza *et al.*, 2008).
- 6- Acidocalcisoma: son orgánulos con forma de vacuola con alta densidad electrónica que actúan de reserva de productos metabólicos y que presentan gránulos de polifosfatos en su interior. Además, acumulan altas concentraciones de calcio y otros cationes como Mg, Na, Zn y Fe (Docampo *et al.*, 2005). Presentan ATPasas que permiten el movimiento de iones mediante la translocación de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^{+}$ . Su finalidad es almacenar calcio y usarlo en ciertos momentos del ciclo de vida del parásito, actúan como almacenamiento de energía al acumular pirofosfatos (PPi), regulan el pH citoplasmático y participan en la osmorregulación (De Souza, 2002).
- 7- Citostoma y reservosoma: el citostoma es una invaginación de la membrana plasmática donde se llevan a cabo actividades endocíticas, aparte de las ocurridas en el bolsillo flagelar (Martins *et al.*, 2012). La invaginación adquiere una forma de embudo que llega a alcanzar la región nuclear, denominándose la estructura formada como citostoma-citofaringe. Las macromoléculas extracelulares se unen a esta región y luego se internalizan mediante vesículas endocíticas que se forman al final de la citofaringe. Tras incorporarse al protozoo, las macromoléculas son procesadas en el reservosoma. Los reservosomas se acumulan en la parte posterior del parásito con forma esférica y con una única membrana. La matriz de los reservosomas es ligeramente densa y contiene proteínas, y presenta algunas inclusiones que contienen lípidos (De Souza, 2002).
- 8- Complejo retículo endoplasmático-aparato de Golgi: ambos presentan funciones similares a las presentes en otros eucariotas. Así, el retículo endoplasmático se expande a lo largo de toda la célula, alcanzando a veces la membrana plasmática (De Souza, 2009). Por su parte, las cisternas del aparato de Golgi se observan en la porción anterior, cerca del cinetoplasto y del bolsillo flagelar. Una característica concreta de *T. cruzi* es que las vesículas provenientes del aparato de Golgi vacían su contenido en el bolsillo

flagelar para liberarlo al medio extracelular con más frecuencia que en el sistema endosomal-lisosomal (De Souza, 2002).

- 9- Núcleo: El núcleo es igual que el de células eucariotas con variaciones en la forma y en la localización celular dependiendo de la etapa de vida del parásito (Martins *et al.*, 2012). Durante la división celular, la membrana nuclear se mantiene intacta durante todo el proceso y no aparecen centriolos en conexión con los microtúbulos ni ninguna otra estructura que participe en su formación (De Souza, 2009). Los microtúbulos intranucleares parecen ser los encargados de mover el material genético a los dos nuevos núcleos en formación, aunque aún no es algo que se sepa con precisión. Por otro lado, el nucleolo no aparece en todas las etapas de vida del parásito (De Souza, 2002).

### **Organización genómica**

La iniciativa de secuenciar el genoma de *T. cruzi* surgió como parte del proyecto denominado “Tritryps” en el que se secuenció conjuntamente el genoma de los kinetoplastidos *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major* (Ash & Jasny, 2005; Kissinger, 2006). La secuenciación del genoma de *T. cruzi* se realizó sobre la cepa CL Brener, una cepa híbrida con dos haplotipos (Esmeraldo y no Esmeraldo). De esta manera, cada cromosoma presentaba dos homólogos diferentes entre sí, dificultando el estudio, para obtener la composición genómica de *T. cruzi* se requirió el empleo de la técnica WGS (secuenciación completa del genoma por técnica de shotgun, del inglés “whole-genome shotgun”). El genoma haploide de *T. cruzi* se ensambló en 8,740 “contigs” presentando un total de 67 megabases (Mb), con unos 12,000 genes codificantes (22,570 proteínas codificadas teniendo en cuenta el genoma diploide), donde aproximadamente cada uno de los dos haplotipos aportó la mitad de los alelos. Por otra parte, se estima que el genoma diploide de *T. cruzi* oscila entre 106.4 y 110.7 Mb, distribuido en 41 pares de cromosomas homólogos cuyos tamaños oscilan entre 74 kb a 2.4 Mb (El-Sayed *et al.*, 2005; Weatherly *et al.*, 2009). Mientras el genoma haploide de otros kinetoplastidos como *T. brucei* y *L. major* se compone de 25 Mb y 33 Mb, con 8,100 y 8,300 genes codificantes respectivamente (Ash & Jasny, 2005).

Al menos el 50% del genoma de *T. cruzi* está formado por secuencias repetidas, que consisten en retrotrasposones, repetidos subteloméricos y familias multigénicas. El gran número de

familias multigénicas encontrado explica en gran medida, el hecho de que *T. cruzi* es el tripanosomátido con el mayor número de genes. En efecto, un 18% de las secuencias codificantes están presentes en más de 14 copias de genes (Arner *et al.*, 2007). Las familias multigénicas más expandidas, consisten en proteínas tipo transsialidasas, mucinas, metaloproteasas, DGF-1 (*dispersed gene family protein 1*), proteínas RHS (*retrotransposon hot spot*) y las proteínas de superficie asociadas a mucinas (*mucin associated surface proteins*, MASP), así llamadas por su asociación en el genoma con los genes de las mucinas (De Pablos & Osuna, 2012). Esta familia, que era desconocida hasta ese momento, representa un 6% del genoma diploide del parásito (Bartholomeu *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2012). En general, en tripanosomátidos son comunes las familias multigénicas que codifican para antígenos de superficie. Particularmente en el estadio tripomastigota sanguíneo, los parásitos están expuestos a las moléculas efectoras del sistema inmune del hospedero, incluyendo anticuerpos específicos. A diferencia de los tripanosomátidos africanos, los tripomastigotas de *T. cruzi* no poseen el mecanismo de variación antigénica, sino que expresan en su superficie varias proteínas diferentes pertenecientes a familias multigénicas, siendo las más caracterizadas las mucinas, las trans-sialidasas y las MASP (Ash & Jasny, 2005; Di Noia *et al.*, 2000; Dos Santos *et al.*, 2012).

En el año 2011 realizaron un análisis comparativo intra-especie entre la cepa CL-Brener (TcVI), previamente secuenciada, y la cepa Sylvio X10/1 (TcI), secuenciada a partir de la tecnología Roche 454. Los resultados mostraron una disminución en el número de copias de genes multicopia en la cepa TcI respecto a la TcVI; además se evidenciaron eventos de delección y cambios no sinónimos en los nucleótidos que afectaron la codificación de los aminoácidos, lo que incidió fuertemente en el tamaño del genoma de Sylvio X10/1. A pesar de esto, no se encontró una gran variación entre la cantidad de ADN presente en las regiones no codificantes (Franzén *et al.*, 2011). En un segundo estudio, se realizó la comparación entre la cepa Sylvio X10/1 (TcI) con otro tripanosomátido, *Trypanosoma cruzi marinkellei*; demostrando una disminución en el tamaño del genoma de este último; esta disminución se debe a una variación en el número de copias de algunos genes codificantes y no codificantes (Franzén *et al.*, 2012).

En el año 2014, se realizó la secuenciación del clon Dm28c, clasificado como TcI al igual que la cepa Sylvio X10/1; ambas relacionadas con el ciclo selvático de transmisión del parásito, para dicho fin, fue empleada la tecnología de secuenciación de Roche 454. La anotación de este

genoma mostró la presencia de 4144 proteínas homólogas en otros organismos. Respecto a la comparación con las cepas Sylvio X10/1 y CL-Brener, se observó una identidad de 98.71% y 90.20% respectivamente, lo que era de esperarse teniendo en cuenta la DTU a la que cada una pertenece; resultados similares fueron obtenidos para el análisis bidireccional de proteínas entre cepas (Grisard *et al.*, 2014).

(Berná *et al.*, 2018) utilizó en el 2018 una tecnología robusta de PacBio Single Molecular Real-Time (SMRT), esta herramienta permitió la secuenciación de segmentos más largos y por tal un ensamblaje mucho más confiable. Esta metodología se aplicó en dos clones, Dm28c (TcI) y TCC (TcVI). Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de un amplio grupo de genes multicopia, genes conservados, transposones y repeticiones en tándem a lo largo del genoma de este parásito. Adicionalmente, los autores mostraron que el genoma de *T. cruzi* se encuentra dividido en dos compartimientos que presentan diferencias en el porcentaje de Guanina-Citosina (GC); uno compuesto por genes conservados e hipotéticos llamado “compartimiento central”, y otro por genes de copia múltiple llamado “compartimiento disruptivo” (Figura 7). Adicionalmente, el ensamblaje de cromosomas homólogos de forma individual permitió determinar la presencia de recombinaciones homólogas entre estos (Berná *et al.*, 2018).

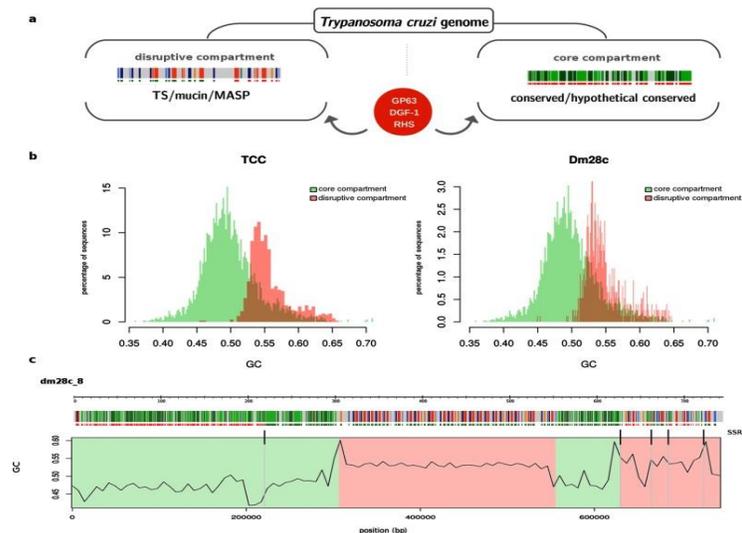


Figura 7. Compartimentalización del genoma de *T. cruzi*. (A) Estructura del genoma propuesta. (B) Porcentaje de GC por cada compartimiento para las cepas TCC y DM28c. Fuente: (Berná *et al.*, 2018).

Posteriormente se realizó la secuenciación por medio de la plataforma PacBio de dos DTUs, TcII (cepa Y) y TcV (Bug2148); este análisis se realizó teniendo en cuenta la diferencia que ha sido descrita entre las DTUs respecto al tamaño del genoma y número de copias para algunos genes. Los resultados obtenidos demostraron que las familias de genes multicopias, donde se encuentran una gran cantidad de genes que codifican para proteínas transmembranales importantes en la virulencia del parásito, se ubicaban cerca de las regiones teloméricas, expuestas a una mayor presión evolutiva. Los autores sugieren la presencia de un genoma “nuclear” que comparte una alta homología entre toda la especie, y una expansión en los genes que codifican para estas proteínas entre las distintas DTUs, lo que podría explicar las características biológicas y virulentas diferenciales entre estas (Callejas-Hernández *et al.*, 2018).

Por medio de la plataforma PacBio, también se logró la secuenciación del genoma de la cepa TcI Sylvio X10/1, demostrando su alta complejidad, la presencia de una gran cantidad de retrotransposones y una alta variabilidad en los grupos de genes multicopia relacionados con los antígenos de membrana presentes en *T. cruzi*; este hallazgo es importante para el análisis y asociación de la virulencia de este parásito (Talavera-López *et al.*, 2021). El análisis de 45 genomas de TcI provenientes de Ecuador, permitió establecer una alta variabilidad intra DTU, donde se encontraron poblaciones fijas con una estructura poblacional sexual y otras clonal. Algunas poblaciones presentaban una alta heterocigosidad, secuencias mitocondriales comunes y niveles de aneuploidía incompatibles con el sexo mendeliano; mientras otras, mostraban menor aneuploidía y una mayor relación con una replicación parasexual (Schwabl *et al.*, 2019).

Recientemente se reportó el análisis de los genomas de las cepas Brazil-B4 (TcI) y la cepa Y (TcII) a partir de estrategias híbridas de secuenciación de fragmentos cortos y largos y mapeos específicos para lograr genoma de alta calidad. Los análisis corroboraron las características de aneuploidía cromosomal dentro del genomas de *T. cruzi*, siendo el cromosoma 24 uno de los más afectados, y adicionalmente, la presencia de variaciones alélicas en segmentos de cromosomas diploides (Figura 9).

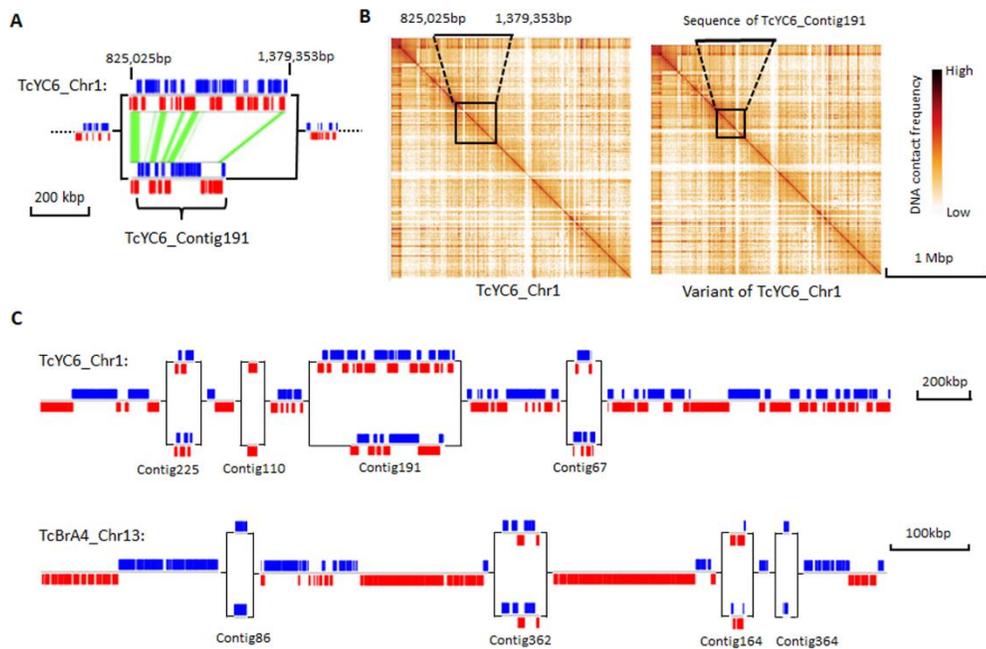


Figura 9. Variación alélica segmental en cromosomas diploides de *Trypanosoma cruzi*. Cromosomas diploides 1 de la cepa Y (TcII) y 13 de la cepa Brazil B4 (TcI), de color rojo y azul cada uno de los alelos, los recuadros muestran áreas con variación alélica donde más de dos alelos son observados. Fuente: (Wang *et al.*, 2021).

Así mismo, reporta procesos de amplificación y dispersión de genes importantes relacionados en su mayoría con las secuencias repetitivas, entre estos: MASPs, mucinas, transialidasas y los puntos calientes de retro-transposones (RHS). Estos genes podían seguir los procesos mencionados involucrando segmentos que incluían más de un gen y que no necesariamente se encontraran relacionados o en el mismo sentido de la hebra, indicando una influencia de procesos recombinación y mutaciones en la diversificación de los genomas de *T. cruzi*. Adicionalmente, se logró determinar la presencia de una gran cantidad de ARN antisentido indicando la influencia de estos en la regulación postranscripcional del parásito (Wang *et al.*, 2021).

### Expresión génica en tripanosomátidos

En muchos puntos del ciclo de vida, los tripanosomátidos sufre una reprogramación de la expresión de sus genes para adaptarse a los diferentes ambientes a los que se enfrenta, sin embargo, los mecanismos que dirigen estos procesos aún no se han definido claramente.

Probablemente debido a la distancia filogenética respecto a otros eucariotas (los flagelados aparecieron hace aproximadamente 1500 millones de años), los tripanosomátidos presentan características biológicas excepcionales. Los múltiples niveles de regulación del inicio de la transcripción, presentes en la mayoría de los eucariotas, no están presentes en los tripanosomátidos (De Gaudenzi *et al.*, 2011; Kramer, 2012). La mayoría de los genes que codifican para proteínas no poseen promotores propios y se expresan en largas unidades policistrónicas, que a diferencia de lo que sucede en los procariontes, no codifican para productos funcionalmente relacionados (Ash & Jasny, 2005), de hecho, genes adyacentes, pueden codificar para proteínas de expresión diferencial en el ciclo de vida del parásito (Minning *et al.*, 2009; Smircich *et al.*, 2015).

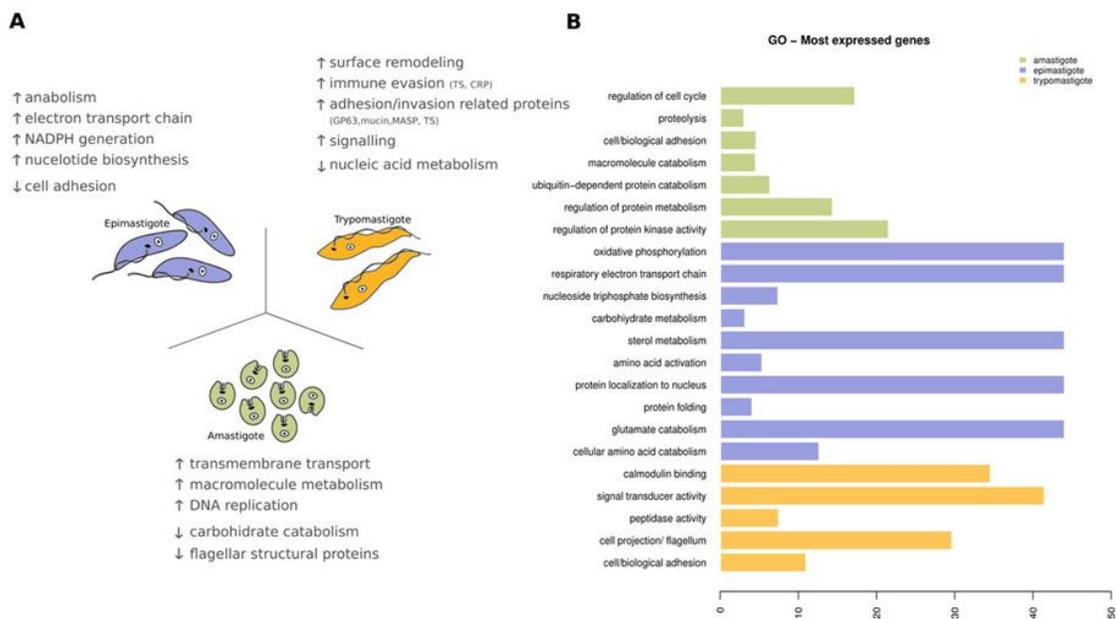


Figura 10. Genes expresados de manera diferencial entre las formas epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. (A) Vías más representativas por estadio. (B) Ontología de genes. Fuente: (Berná *et al.*, 2017).

*T. cruzi* presenta una alta plasticidad, relacionada principalmente con la capacidad de adaptación a distintos ambientes de estrés durante su ciclo de vida, donde las formas epimastigotes presentan una alta expresión de proteínas asociadas al metabolismo energético, los tripomastigotes derivados de células exhiben una expresión relacionada con la evasión del sistema inmune del hospedero, y finalmente, los amastigotes muestran la expresión de genes

relacionados con la progresión del ciclo de vida. Lo anterior comprueba la importancia de cada una de las formas de vida de *T. cruzi* en la progresión de su ciclo de vida (Berná *et al.*, 2017).  
 Figura 10.

### Regulación de la expresión génica en Tripanosomátidos

En eucariotas los genes que codifican para proteínas son transcritos 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 transcritos 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* (Günzl *et al.*, 1997; Kooter & Borst, 1984; Lee & Van der Ploeg, 1997; Rudenko *et al.*, 1989).

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 (Clayton & Shapira, 2007). (Figura 11).

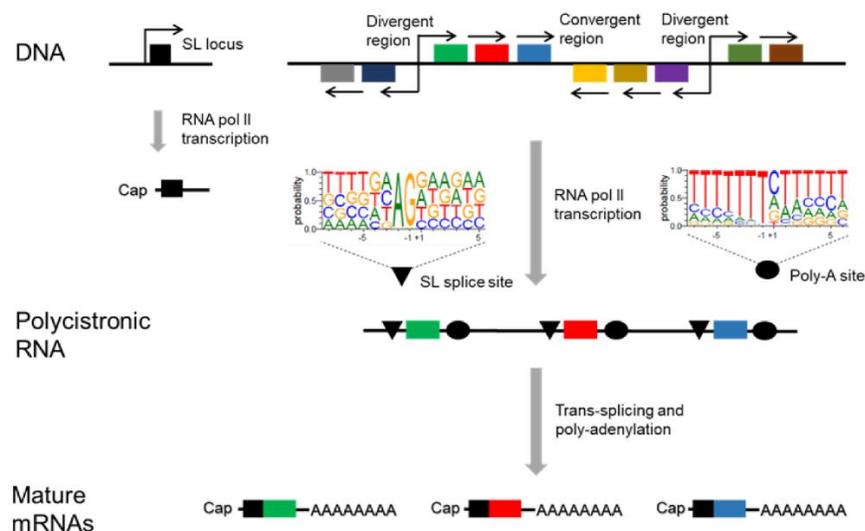


Figura 11. Proceso de transcripción de *T. cruzi*. La ARN polimerasa II produce ARN policistrónicos que se modifican mediante empalme trans y poliadenilación. Los ARNm

maduros finales contienen la tapa con el SL y la cola poli A. SL: líder empalmado. Fuente: (Herreros-Cabello *et al.*, 2020).

Estos genes codifican para proteínas que pueden tener funciones no relacionadas, es decir, que no necesariamente están implicadas en una vía metabólica similar. 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 (Stanne & Rudenko, 2010).

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 (Stanne & Rudenko, 2010).

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 ARN mensajero por medio de una reacción de esterificación durante el proceso de trans-splicing (Das *et al.*, 2005; Günzl *et al.*, 1997; Schimanski *et al.*, 2005; Teixeira, 1998). Si bien se sabe muy poco acerca de la regulación del trans-splicing en estos organismos, se han identificado ciertos factores como los homólogos de las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP) como posibles reguladores de este proceso (Gupta *et al.*, 2013; Manley & Tacke, 1996). 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 (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

### **Regulación post-transcripcional**

Debido a la organización genómica y a que todos los precursores de ARN policistrónico se transcriben aproximadamente a la misma tasa, se ha propuesto que la regulación de la expresión de genes ocurre básicamente a nivel post-transcripcional (Clayton, 2002a; Gomez *et al.*, 2010; Ouellette & Papadopoulou, 2009). Además, la ausencia de elementos canónicos conservados como promotores de la ARN polimerasa II (Clayton, 2002b; Gomez *et al.*, 2010; Smircich *et*

*al.*, 2013), apoya el hecho que la regulación de la expresión génica ocurra básicamente por mecanismos post-transcripcionales. En este contexto se han evidenciado algunas estrategias por parte del parásito para aumentar el nivel de expresión de ciertos genes. Una de ellas consiste en aumentar el número de copias del gen de interés en el genoma resultando en arreglos repetidos en tándem para ciertos genes de alta expresión (Iantorno *et al.*, 2017).

Las modificaciones de la cromatina también juegan un importante rol, ya que los inicios y finales de la transcripción de las unidades de transcripción policistrónicas están marcados de forma epigenética por variantes de histonas/histonas modificadas post-traduccionalmente (Duhagon *et al.*, 2001; Respuela *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2009).

Por otro lado, existen factores que actúan en trans a nivel de proteínas de unión al ARN (RBP) (Clayton, 2013; Pérez-Díaz *et al.*, 2013) e interaccionan con secuencias en cis, principalmente localizadas en las regiones no traducidas de los mensajeros (UTR). Se ha demostrado que las RBP establecen interacciones con grupos de ARNs que comparten elementos en cis, definiendo grupos co-regulados de mensajeros que podrían cumplir funciones relacionadas (Keene, 2007).

Otro nivel de regulación de la expresión génica es la localización diferencial de los ARN mensajeros en la célula. Ha sido demostrado recientemente que el compartimento nuclear juega un rol en el control de los mecanismos de regulación de la expresión génica en este parásito (Pastro *et al.*, 2017). Los mensajeros que no son requeridos en el estadio epimastigota no serían procesados eficientemente y a su vez se acumularían en el núcleo como forma de impedir su traducción. A su vez, los mensajeros cuyos productos son altamente requeridos, serían procesados y acumulados en el citoplasma, probablemente debido a un aumento de su vida media, garantizándose así su traducción (Pastro *et al.*, 2017).

Recientemente, se ha enfatizado en el estudio del rol de la eficiencia traduccional de los mensajeros, como forma de regular la abundancia proteica en los tripanosomátidos (Da Silva Augusto *et al.*, 2015; Smircich *et al.*, 2015).

### **Trans-splicing**

En los tripanosomátidos, los ARNs policistrónicos son procesados por mecanismos intermoleculares de trans-splicing y poliadenilación para dar lugar a los ARNs mensajeros

individuales, como se esquematiza en la Figura 7. El trans-splicing es un proceso mediante el cual se agrega a los ARN mensajeros transcritos primarios una secuencia de ARN (“spliced leader” o “SL” o “miniexón”) de 39 nucleótidos al extremo 5’, en una posición ubicada unos nucleótidos antes del sitio de inicio de un marco abierto de lectura (Pays *et al.*, 1994). La secuencia del miniexón proviene del extremo 5’ de un ARN pequeño nuclear (snRNA), el ARN SL, que está compuesto por 120 nucleótidos y no está poliadenilado (Agabian, 1990). La adición del miniexón se produce en un sitio consenso constituido por un dinucleótido AG localizado corriente arriba del codón de iniciación a distancias variables (Agabian, 1990), y generalmente está precedido por un tracto de polipirimidinas. Este fenómeno ocurre co-transcripcionalmente (Ullu *et al.*, 1993) y es fundamental para la traducción correcta de los mensajeros (Figura 7).

### **Poliadenilación**

Previo al proceso de trans-splicing, el miniexón adquiere en su extremo 5’ una estructura CAP necesaria para el procesamiento del miniexón (Ullu & Tschudi, 1991). Se sugiere que una función de la secuencia del miniexón o “spliced leader” es la de proveer la estructura CAP a los ARNm (Lenardo *et al.*, 1985). En tripanosomátidos esta estructura, denominada CAP 4, consiste en una 7-metilguanosa y los cuatro primeros nucleótidos modificados por adición de grupos 2’O-metilo (Bangs *et al.*, 1992). El proceso de poliadenilación en *T. cruzi* es similar al resto de los eucariotas superiores. En el mismo participa una endonucleasa de restricción específica que corta el pre-mensajero en su extremo 3’ y la enzima poliA polimerasa que incorpora adenosinas a expensas de ATP. A diferencia con los eucariotas superiores, para los cuáles se ha descrito una secuencia conservada AAUAAA que actúa como señal de poliadenilación (Wahle & Keller, 1992), en tripanosomátidos, no se ha podido describir una secuencia consenso. Sin embargo, se ha demostrado la importancia del trecho de polipirimidinas que interviene en el trans-splicing de los genes en el extremo 5’ en la poliadenilación del extremo 3’ del gen previo (Schürch *et al.*, 1994).

Los transcritos mitocondriales requieren una maduración que involucra la adición, o menos frecuentemente, la delección de residuos de ribonucleótidos (particularmente uridinas) en un proceso denominado “editing” (Shaw *et al.*, 1988). El “editing” resulta en cambios de la secuencia codificante del ARNm no dirigidos por el ADN molde sino por ARN guías codificados por los minicírculos.

## Degradación ARNm

La mayoría de los ARNm de eucariotas son degradados por exonucleasas que actúan en ambos extremos de la molécula. El decaimiento mediado por exonucleasas comienza con el acortamiento de la cola poliA por el complejo PAN2 y PAN3, por el complejo de deadenilación CCR4-NOT o por la deadenilasa PARN (poliA ribonucleasa) (Chen & Shyu, 2010). La deadenilasa que participa en la degradación de un ARNm específico depende de las proteínas que interactúan con el mismo. Luego de la deadenilación, las enzimas de decapado DCP2 o NUDT16 remueven el cap5' (Parker & Song, 2004). Las actividades requeridas para el decaimiento del ARNm en la vía 5'-3' se concentran en cuerpos de procesamiento ribonucleoproteicos citoplasmáticos (P bodies) que contienen ARNm, las enzimas de remoción del cap 5' (decapping) tales como Dcp1 y Dcp2 y enzimas hidrolíticas 5'-3' (Xrn1) así como también proteínas que asisten el decapping tales como Dhh1, Pat1, Edc1, Edc2 y Edc3 y el complejo Lsm1-7 (Balagopal & Parker, 2009; Franks & Lykke-Andersen, 2008; Parker & Sheth, 2007).

En tripanosomas, se han encontrado ortólogos de los complejos deadenilasa (Schwede *et al.*, 2008), de homólogos de las proteínas Dhh1, SCD6 y XRNA (el ortólogo de Xrn1) (Holetz *et al.*, 2007; Kramer, 2012; Li *et al.*, 2006), y una proteína ARN helicasa marcadora de P bodies que es necesaria para la eficiente remoción del cap 5' de los ARNm antes de su degradación (Coller *et al.*, 2001). A diferencia de levaduras y metazoarios, no se han identificado en el genoma de tripanosomátidos enzimas de decapping (Dcp1 y Dcp2) así como tampoco las proteínas que colaboran en este proceso (Lsm1, Edc3 y Pat1), sin embargo, se ha detectado función enzimática de decapping en extractos proteicos de tripanosomátidos (Milone *et al.*, 2004). En este contexto se sugiere la existencia de una ruta específica para el inicio de la degradación 5' de los ARNm que involucraría enzimas de decapping no canónicas en tripanosomátidos (Kramer *et al.*, 2010). Los intermediarios sin cap 5' son degradados ya sea por exonucleasas 5'-3' (J. Coller & Parker, 2004) o por el exosoma en dirección 3'-5' (Dziembowski *et al.*, 2007; Haile *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Schaeffer *et al.*, 2009).

En eucariotas puede ocurrir clivaje endonucleolítico mediante endonucleasas secuencia específicas. Este mecanismo se ha visto involucrado en los procesos de vigilancia de la calidad del mensajero como NMD o NSD (non sense mediated decay o non stop decay) o en respuesta

a microARNs o siARNs (Parker & Song, 2004). A diferencia de la mayoría de las rutas de degradación de ARNm, el NMD se restringe solo para los ARNs recién sintetizados. En este proceso, se eliminan los ARNm que poseen un codón de finalización de la traducción prematuro el cual es reconocido por un complejo proteico que incluye al factor UPF1 (Schoenberg & Maquat, 2012). No está claro si el proceso NMD clásico existe en tripanosomátidos, pero sí se ha descrito el homólogo de este factor UPF1 en *T. brucei* (Delhi *et al.*, 2011). Además, la existencia de regulación de la degradación selectiva de ciertos ARNm sugiere fuertemente la presencia de programas de decaimiento de ARN específicos también en tripanosomátidos (C. Clayton *et al.*, 2008).

### **Proteínas de unión al ARN en *T. cruzi***

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 mRNA 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 (Hentze *et al.*, 2018). Figura 12.

La mayoría de las RBPs identificadas en *T. cruzi* no han sido aún caracterizadas, y muchas de ellas parecen ser exclusivas de tripanosomátidos lo cual sugiere una función específica del parásito. Dentro de las pocas RBPs caracterizadas en *T. cruzi* se incluyen diversos motivos de unión al ARN (Araújo & Teixeira, 2011; Kramer & Carrington, 2011). Se han identificado proteínas con motivos dedo de Zinc tipo CCCH en tripanosomátidos (Caro *et al.*, 2005; Mörking *et al.*, 2004, 2012). Existe evidencia de que estas proteínas dedo de zinc (ZFP) tienen un rol en procesos de diferenciación y al menos una de ellas (ZFP3) funciona como regulador de la traducción (Kramer, 2012). Otro motivo de unión al ARN caracterizado en *T. cruzi* son las proteína de unión a ARN específica de secuencia Pumilio (PUM) que actúa como un represor postranscripcional presente en proteínas que regulan la expresión de ARNm mediante la interacción con secuencias específicas en la región 3'UTR a la vez que reclutan proteínas que degradan el ARN o ejercen represión traduccional (Wharton & Aggarwal, 2006). Se han analizado 10 proteínas con motivo Pumilio (proteínas Puf) en *vsdsd* y se las ha dispuesto en diferentes grupos según la predicción de su probabilidad de unión al sitio canónico de unión a

nano elemento de respuesta Pumilio (NRE) de 32pb. En el grupo 1 (TcPuf1 y TcPuf2) se encuentran aquellas proteínas que se unen a la secuencia NRE completa. Las proteínas del grupo 2 (TcPuf3-6, TcPuf9) se unirían al menos a un motivo conservado dentro de la secuencia NRE, mientras que las proteínas del grupo 3 (TcPuf7-8, TcPuf10) son más diversas y se unen a secuencias diferentes al NRE (Caro *et al.*, 2006). La interacción con el NRE fue experimentalmente probada para las proteínas TcPuf1 y TcPuf6 (Caro *et al.*, 2006; Dallagiovanna *et al.*, 2005). Para TcPuf6 se identificaron mediante cromatografía de afinidad en tandem ocho ARNm blanco, los cuales aparecían disminuidos cuando TcPuf6 estaba sobrepresada indicando una función desestabilizadora de la proteína sobre sus ARNm blanco (Dallagiovanna *et al.*, 2008). Inicialmente, en el genoma de *T. cruzi* se identificaron 77 proteínas de unión al ARN con el motivo RRM (De Gaudenzi *et al.*, 2005), luego, con otros criterios de búsqueda, se identificaron 4 proteínas más haciendo un total de 81 proteínas con RRM en *T. cruzi* (Alves *et al.*, 2013). Solo unas pocas de estas proteínas tienen ortólogos en otros eucariotas que no sean los Trityps, alguna de ellas son la PABP, el factor de inicio de la traducción eIF3B y el factor de splicing U2AF35. De las proteínas exclusivas de kinetoplastos, solo unas pocas han sido caracterizadas experimentalmente y todas ellas juegan un rol en la regulación de la estabilidad de los ARNm (Kramer & Carrington, 2011). Un ejemplo representativo de RRM en *T. cruzi* es la proteína TcUBP1. TcUBP1 está involucrada en la estabilización estadio específica de ciertos ARNm en el citoplasma (D'Orso & Frasch, 2001). La caracterización de esta proteína surge con el objetivo de identificar factores de unión a elementos ARE presentes en la región 3'UTR del ARNm de proteínas mucinas (TcSMUG) (Di Noia *et al.*, 2000). Además de unirse a TcSMUG, la proteína TcUBP1 interacciona con otros 39 transcritos (Noé *et al.*, 2008), reconociendo un elemento estructural en forma de horquilla en la región 3'UTR de los mismos. TcUBP1 puede homodimerizar y puede formar un gran complejo ribonucleoproteico junto con la proteína TcUBP2 y la PABP (D'Orso & Frasch, 2002). Se postula que la proteína TcUBP1 es un factor desestabilizador ya que su sobrepresión desestabiliza el ARNm que codifica para TcSMUG (D'Orso & Frasch, 2001). Tanto TcUBP1 como TcUBP2 se localizan principalmente en el citoplasma del parásito, pero en condiciones de estrés nutricional, estas proteínas son movilizadas a gránulos de estrés (Cassola *et al.*, 2007) participando en la protección de los transcritos asociados. En parásitos estresados con arsenito, TcUBP1 y TcUBP2 se acumulan gradualmente en el núcleo, lo que llevó a proponer que el RRM actuaría, al menos en el caso de

TcUBP1, como señal de localización nuclear (De Gaudenzi *et al.*, 2005). Otras proteínas con RRM estudiada en *T. cruzi* son la proteína TcRBP3 que interacciona con un grupo de ARNm los que mayoritariamente codifican para proteínas ribosomales (Noé *et al.*, 2008) y la proteína TcRBP40 que une algunos ARNm que contienen en sus 3'UTR secuencias ricas en AG (Guerra-Slomp *et al.*, 2012). La existencia de niveles adicionales de control, tales como el procesamiento del ARNm, la exportación de los ARNm al citoplasma, la modulación de la vida media de los ARNm o de las proteínas y las modificaciones post-traduccionales, sugieren que la regulación global de la expresión génica es un proceso bastante complejo en el que participan varios factores en trans. La observación de que muchas de las proteínas de unión al ARN en tripanosomátidos carecen de un ortólogo en otros eucariotas, provee una plataforma interesante para identificar nuevos procesos y un uso potencial en el diseño racional de nuevas drogas. Sin embargo, mientras que las proteínas de unión al ARN toman cada vez más y más relevancia en diferentes aspectos de la regulación post-transcripcional, se conoce aún muy poco sobre los elementos reconocidos y la mecánica de interacción de las RBP en *T. cruzi*.

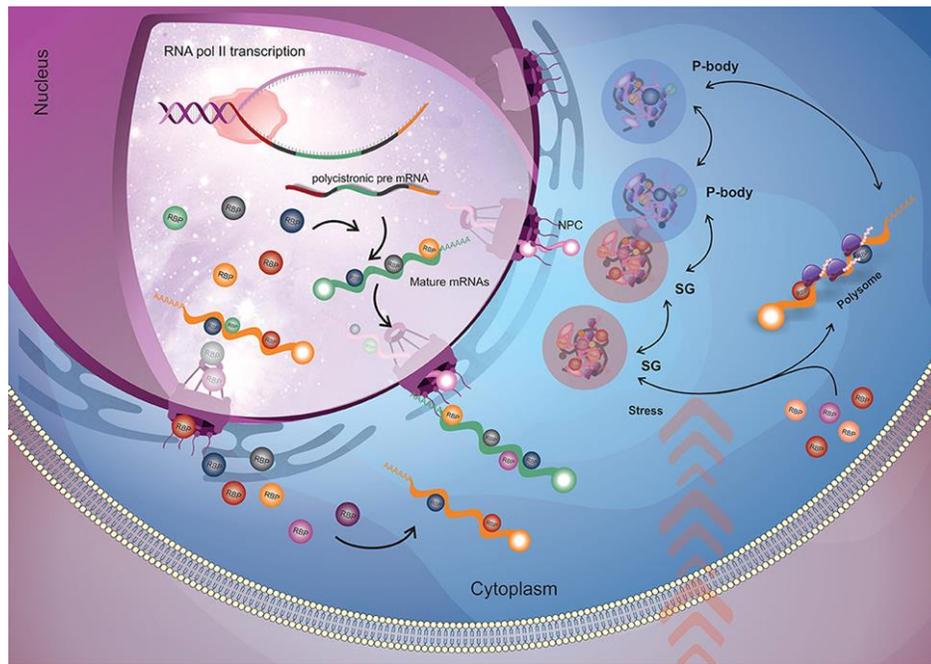


Figura 12. Flujo general de la participación de las Proteína de unión a ARN (RBPs) en el metabolismo del mRNA. Las RBPs nucleares interactúan con dominios del mRNA tan pronto como comienzan a ser transcritos por la ARN polimerasa II (ARN pol II) y modulan la maduración del ARNm (trans-splicing y poliadenilación) y los procesos de exportación

nuclear. Cuando los ARNm llegan al citoplasma, las RBPs citoplasmáticas provenientes del núcleo encaminan una señalización combinatoria determinando el destino de los ARNm dirigiéndolos a la maquinaria de traducción o a los gránulos de RNP para su almacenamiento o degradación. Fuente: (Romagnoli *et al.*, 2020).

## **Calmodulina**

La calmodulina es una de las proteínas más abundante del reino animal; su función se ha asociado con el control de muchos procesos celulares, mediante la detección de trazas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Chin & Means, 2000; Klee & Vanaman, 1982). En mamíferos la calmodulina ha sido descrita como una proteína polivalente que participa en diversas rutas celulares, como por ejemplo en la síntesis y degradación de nucleótidos cíclicos y fosfoinosítidos, fosforilación/desfosforilación de múltiples proteínas a través de varias proteínas quinasas y fosfatasaes específicas, transcripción de genes y regulación de diferentes sistemas de transporte. Además, se ha estudiado su papel en el control del metabolismo, la organización del citoesqueleto, la citocinesis, la contracción muscular, osmosis, la exocitosis, la comunicación intracelular, la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Benaim & Villalobo, 2002; Carafoli *et al.*, 2001; Chin & Means, 2000; Klee & Vanaman, 1982).

## **Rol de la calmodulina en las células en Tripanosomátidos**

En tripanosomátidos calmodulina se ha asociado con múltiples funciones diferentes como la regulación del crecimiento en *T. brucei* (Eid & Sollner-Webb, 1991), la estimulación de la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina en *T. cruzi* (Téllez-Iñón *et al.*, 1985), quinasa dependiente de calmodulina en *T. cruzi* (Ogueta *et al.*, 1994), transducción de señales en la vía GMPc-óxido nítrico en *T. cruzi* (Paveto *et al.*, 1995), y estimulación de la membrana plasmática  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de *L. braziliensis* (Benaim & Romero, 1990), *L. mexicana* (Benaim, 1996), *T. cruzi* (Benaim *et al.*, 1995) y *T. brucei* (Benaim *et al.*, 1993).

## **Loci de calmodulina en *T. cruzi***

*T. cruzi* presenta al menos ocho copias en tándem del gen de la calmodulina que codifica la misma proteína, pero con diferentes espaciadores intergénicos y organizados en dos *loci*

*diferentes*: CAL A y CAL B, basados tanto en la longitud del espaciador intergénico como en la transcripción de ARNm de 1,6 y 1,1 kb, respectivamente (Chung & Swindle, 1990).

Dentro de los dos loci, los genes de calmodulina se han asignado como miembros de las familias de genes CalA o CalB. El locus 2.65 contiene dos genes CalA (CalA1 y CalA2) y un solo gen CalB (CalB1). El locus 2.8 consta de tres genes CalA (CalA3, CalA4 y CalA5) y dos genes CalB (CalB2 y CalB3). Tanto los loci de calmodulina como los genes de ubiquitina se transcribirían a partir de la misma hebra de ADN que los genes de ubiquitina corriente abajo. La transcripción de los genes de calmodulina da como resultado la generación de dos ARNm estables (Chung & Swindle, 1990). La Figura 13. Muestra un diagrama del locus de la calmodulina en el haplotipo Esmeraldo de *T. cruzi* CL Brener. Dos espaciadores de 1.388 y 702 nt separan los pares TcCLB.507483.50 – TcCLB.507483.39 y TcCLB.507483.39 – TcCLB.507483.30, respectivamente (Samudio & Brandão, 2018).

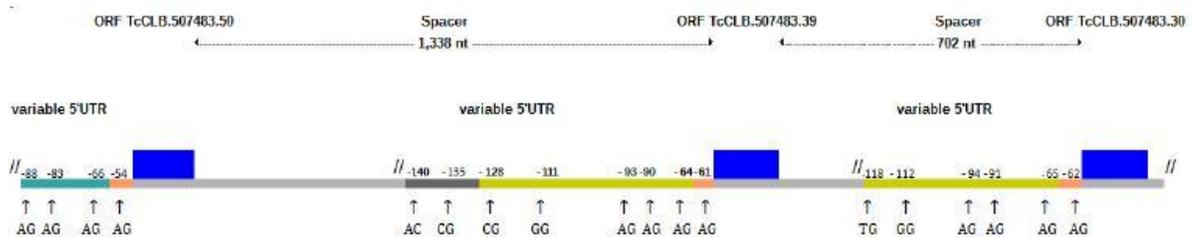


Figura 13. Diagrama del locus de calmodulina de *T. cruzi* y frecuencia de las secuencias variantes de ARNm. El locus muestra tres copias en tándem que están separadas por dos segmentos intergénicos de 1388 y 702 nt. Recuadro azul: ORF; barras coloreadas: UTR 5' que resulta de los múltiples sitios de empalme trans detectados en la etapa de epimastigote; en naranja y amarillo el segmento 5'UTR común a tres o dos ejemplares, respectivamente. Las flechas y los números a la izquierda del cuadro azul indican la posición aproximada del sitio de corte y empalme trans (y el dinucleótido respectivo debajo de las flechas), que también definen el comienzo de 5' UTR en el genoma para cada ARNm. Fuente: (Samudio & Brandão, 2018).

En este estudio nos enfocamos en el diseño de una metodología para lograr la capturar de proteínas de unión a ARN específicas que interactúan con el motivo ubicado en el mRNA policistrónico del espaciador menor del locus de calmodulina.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### **Cultivo celular:**

Las formas epimastigotas del clon 1551A5 de *T. cruzi* fueron cultivadas en medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los pases de este clon fueron realizados cada siete días y solo se utilizaron cultivos en fase exponencial para realizar los experimentos (Camargo, 1964).

#### **Extracción de DNA:**

Los parásitos en fase exponencial de crecimiento fueron centrifugados a 10,000g por 10 minutos y el sedimento de los parásitos se lavó tres veces con PBS utilizando la misma velocidad de centrifugación. El sedimento obtenido fue re suspendido en 300µl de PBS y el ADN fue extraído utilizando el kit comercial Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. La integridad del DNA fue evaluada en geles de agarosa 0.8% y el DNA fue cuantificado mediante fluorescencia utilizando un equipo Qubit Fluorometric Quantitation | Thermo Fisher Scientific, US.

#### **Amplificación del espaciador menor de calmodulina:**

Para la amplificación del espaciador intergénico se utilizaron los cebadores 5UTRcal y T73UTRcal (tabla 1) (Brandão & Fernandes, 2006), los cuales hibridaron en regiones conservadas del locus de calmodulina y amplificando el espaciador intergénico completo incluyendo las regiones no traducidas de este gen. Ciento y cincuenta nanogramos fueron utilizados en la reacción de PCR con las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial: 96°C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 72°C por siete minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% utilizando como amortiguador TBE 0.5X y teñidos con bromuro de etidio. Los resultados fueron foto documentados utilizando un sistema BioDoc-Itm system de la empresa UVP. Para purificar los productos amplificados se utilizaron el kit

comercial wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla 1. Cebadores utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia	Posición en el espaciador menor
5UTRcal	GGAGATCTGCTCGTTGGACA	ORF
Aptamer1	<b>CCGGCCCGCGACTATCTTACGCACTTGCATGATTC</b> <b>TGGTCGGTGGGCGCAGCTCAGCTGT</b>	295-312
Aptamer2	<b>CCGACCAGAATCATGCAAGTGCCTAAGATAGTCG</b> <b>CGGGCCGGTGGAGCAGAGAAGGAGGTTG</b>	355-354
T73UTRcal	<b>TAATACGACTCACTATAGGG</b> <b>GGCCAAATCAACTACGAGGA</b>	ORF

### **Clonación de los Productos Amplificados:**

Para clonar los productos de PCR se utilizó el kit pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA). Para ligar el producto amplificado al vector pGEM®-T Easy se calculó la proporción inserto: vector ideal para el producto amplificado y se colocó 1 a 3µl del producto amplificado siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones de ligación y los controles fueron incubados por una hora a temperatura ambiente y posteriormente a 4°C durante toda la noche. Después de la ligación cada reacción fue almacenada a -20°C hasta su uso posterior. Para transformar las células competentes se colocó 2µl de reacción de clonación en tubos de microcentrífuga conteniendo 100µl de células competentes *Escherichia coli* del linaje DH5α previamente descongeladas en hielo. Seguidamente los tubos fueron colocados en hielo, incubados por 15 minutos e inmediatamente sometidos a un choque térmico a 42°C por un minuto. Posteriormente se adiciono 1ml de medio LB sin antibiótico al tubo y las células fueron incubadas a 37°C por 50 minutos concluyendo de esta forma la etapa de transformación. Placas de LB con ampicilina a una concentración de 100µg/ml, 40µg/ml de X-gal y 500 µM de IPTG en solución fueron preparadas para el cribado de colonias con el inserto. Al menos 20 colonias blancas fueron escogidas y expandidas en medio LB con antibiótico (ampicilina 100µg/ml) para la purificación

del plásmido. Los plásmidos fueron purificados utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA) según las recomendaciones del fabricante.

### **Secuenciación:**

Los plásmidos obtenidos de cada clon fueron secuenciados utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) siguiendo la metodología descrita por el fabricante ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Para la reacción de secuenciamiento se utilizó los iniciadores 5UTRcal y T7UTRcal (cuadro 1) y 50ng del plásmido. La electroforesis de los productos de la reacción de secuenciamiento fue realizada en un equipo Applied Biosystems modelo 3500xL Genetic Analyzer 24-Capillary Array, 36 cm, utilizando la plataforma de secuenciamiento por el método de Sanger del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud. La edición de las secuencias obtenidas y la eliminación de las secuencias del plásmido fue realizada utilizando la suite bioinformática UGENE (Okonechnikov *et al.*, 2012).

### **Detección de Proteínas que se unen al espaciador menor de calmodulina.**

#### **Transcripción *in vitro*:**

Se utilizará un método *in vitro* basado en la utilización de RNA como señuelo para determinar las proteínas que se unen al espaciador intergénico del locus de calmodulina. Este método centrado es basado en la metodología desarrollada por Butter y colaboradores (Butter *et al.*, 2009) en la cual las proteínas de un extracto celular son capturadas por un RNA unido a un aptámero que tiene una alta afinidad por estreptavidina. Para tal fin se amplificó el espaciador intergénico por extensión de iniciadores utilizando el iniciador T75utrcal: 5'-**TAATACGACTCACTATAGGGGGAGATCTGCTCGTTGGACA**-3' cuya secuencia en negrita representa el promotor del fago T7 y el iniciador 3utrcalAPT: 5'-GGTCAAATCAACTACGAGGAACCGACCAGAAUCAUGCAAGUGCGUAAGAUAG**UCGCGGGCCGGGG**-3' que muestra en negrita la secuencia del aptámero S1 el cual se une con alta afinidad a la estreptavidina. La inserción de estos elementos dentro de la secuencia del espaciador permitió la transcripción *in vitro* de los fragmentos amplificados y la ligación de los mismos a esferas paramagnéticas de estreptavidina. La transcripción *in vitro* se realizó utilizando MEGAscript® T7 Transcription Kit siguiendo la metodología descrita por los

fabricantes (www.thermofisher.com). Después de la transcripción *in vitro*, removimos los nucleótidos no incorporados, oligonucleótidos cortos, proteínas y sales para purificar el RNA transcrito utilizando el kit MEGAclean™ Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (www.thermofisher.com). El RNA transcrito fue cuantificado mediante fluorescencia utilizando un equipo Qubit Fluorometric Quantitation | Thermo Fisher Scientific, US, Donde los tintes se unen selectivamente a las biomoléculas de interés y la intensidad de la fluorescencia emitida refleja directamente la cantidad de moléculas de ADN o ARN en la muestra.

### **Extracto celular de *T. cruzi***

Fueron utilizados cultivos en fase exponencial de crecimiento para preparar los extractos celulares de *T. cruzi*. Los parásitos fueron lavados con PBS a 10,000g por 10 minutos. El sedimento de los parásitos fue resuspendido en una solución de M-PER y Halt™ Protease Inhibitor Cocktail para extraer proteínas nucleares y citoplasmáticas siguiendo las indicaciones del fabricante (www.thermofisher.com). Para la cuantificación del extracto celular se utilizó Pierce BCA Protein Assay Kit siguiendo la metodología recomendada por el fabricante (www.thermofisher.com).

### **Captura de las proteínas que se unen al espaciador por RNA-Pull Down:**

Veinticinco microgramos del RNA marcado con el aptámero S1 obtenido de la transcripción *in vitro* fue ligadas a esferas paramagnéticas de estreptavidina C1 (ThermoFisher Scientific) en un amortiguador de ligación a RNA [100 mM NaCl, 50 mM Hepes.HCl (pH7.4), 0.5% Nonidet P-40, 10 mM MgCl<sub>2</sub>] incubando por 30 minutos a 6 °C con movimiento continuo. Posteriormente las esferas fueron lavadas tres veces [150 or 250 mM NaCl, 50 mM Hepe.HCl (pH 7.4), 0.5% Nonidet P-40, 10 mM MgCl<sub>2</sub>], antes de incubarlas con 400µg de extracto de proteínas nuclear y citoplasmáticas por 30 minutos a 6 °C, 40 unidades de inhibidores de RNase (ThermoFisher Scientific) y 20µg de tRNA de levadura (ThermoFisher Scientific). Después del acoplamiento, ambas fracciones fueron combinadas y se les realizaron lavados astringentes para reducir las uniones no específicas. La elución de los complejos de RNA-proteínas fueron hechas mediante competitividad utilizando un amortiguador conteniendo 16 mM de biotina. Posteriormente se realizó la digestión con tripsina en solución y se quitaron las sales de las muestras mediante desalinización (Rappsilber *et al.*, 2003) y luego se realizó una electroforesis vertical de

proteínas, en una cámara marca, MINI-PROTEAN® SERIES Bio-Rad, para detectar la presencia de las proteínas aisladas.

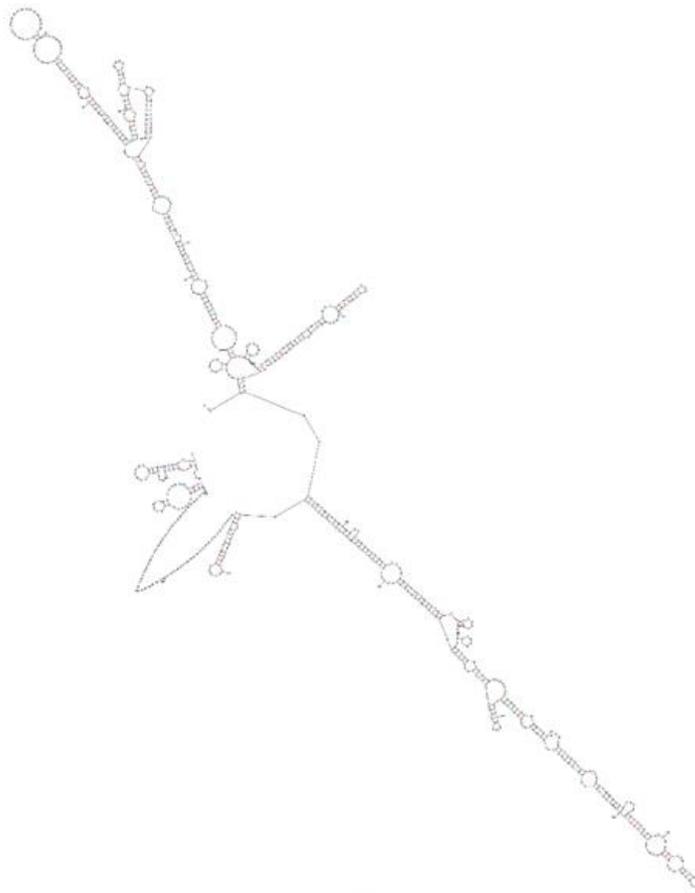
## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS**

#### **Análisis in silico del transcripto sintético**

Se realizo un análisis in silico para insertar el aptámero alto de estreptavidina (S1) en el medio del espaciador menor del locus de calmodulina. El gen de la calmodulina de *T. cruzi* (clon CLBrener) (incluido el espaciador mayor y menor) se obtuvo de GenBank (número de acceso

XM\_802998.1, XM\_802996.1 y XM\_802995.1). Se realizo una simulación de la estructura secundaria ARNm del espaciador menor usando el software Mfold versión 2.3 (Zuker, 2003) antes y después de la inserción del aptámero S1 en varios puntos de los espaciadores menores hasta encontrar el sitio de inserción donde no existiera disrupción de estructura secundarias. La Figura 14 muestra el transcritto de ARN del espaciador menor del locus de calmodulina en su estado natural y la figura 15 Muestra esta misma estructura mas la inserción del aptámero de alta afinidad a estreptavidina sin disrupción secundaria de su estructura nativa.



dG = -192.90 19Sep04-12:15:13

Figura 14. Estructura secundaria putativa del espaciador menor del locus de calmodulina estimado por el software Mfold.

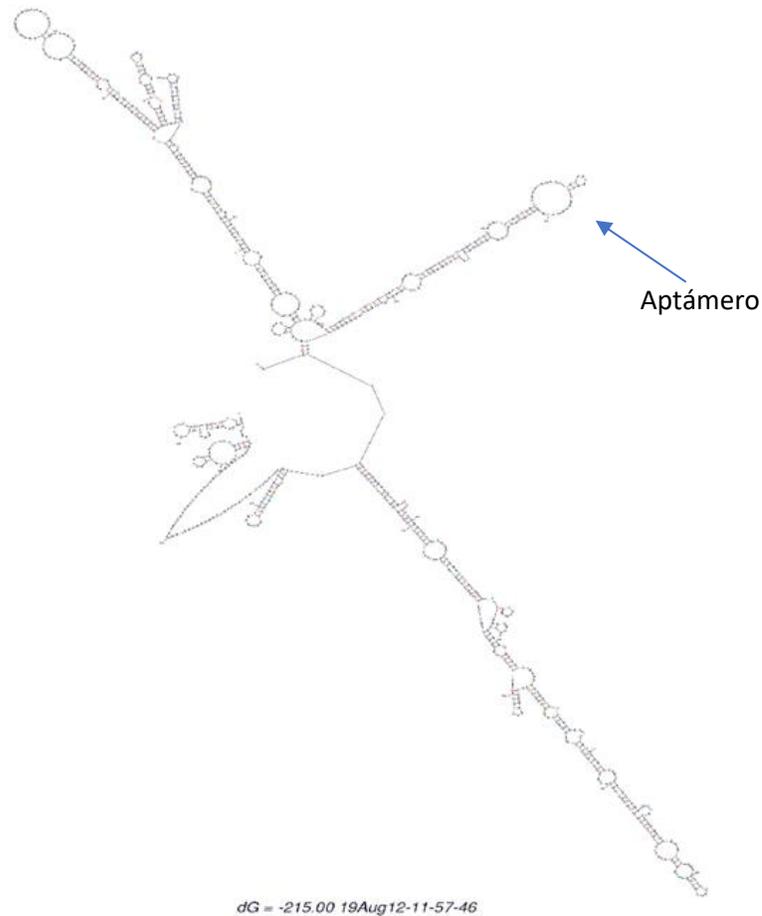


Figura 15. Posición de inserción del Aptámero en la base 312 del espaciador de calmodulina estimada por el software Mfold.

### **PCR recursiva para insertar el aptámero en el espaciador menor de calmodulina**

Después del análisis in silico, se diseñó una PCR recursiva (figura 16), método descrito por primera vez por Walker y colaboradores (2008) para construir una secuencia sintética utilizando el espaciador menor de calmodulina la cual incluyera el aptámero de alta afinidad a estreptavidina. Se pudo identificar todos los elementos del locus de calmodulina y diseñar todos los cebadores (Tabla 1) necesarios para agregar el aptámero S1 en el espaciador menor mediante el uso del paquete bioinformático UGENE versión 1.32.0. (Okonechnikov *et al.*, 2012). Los resultados de la amplificación se muestran en la figura 17 donde se puede apreciar el tamaño de

los fragmentos Apta1 374 y Apta2 531y posterior su recombinación un fragmento total de 905 pb.

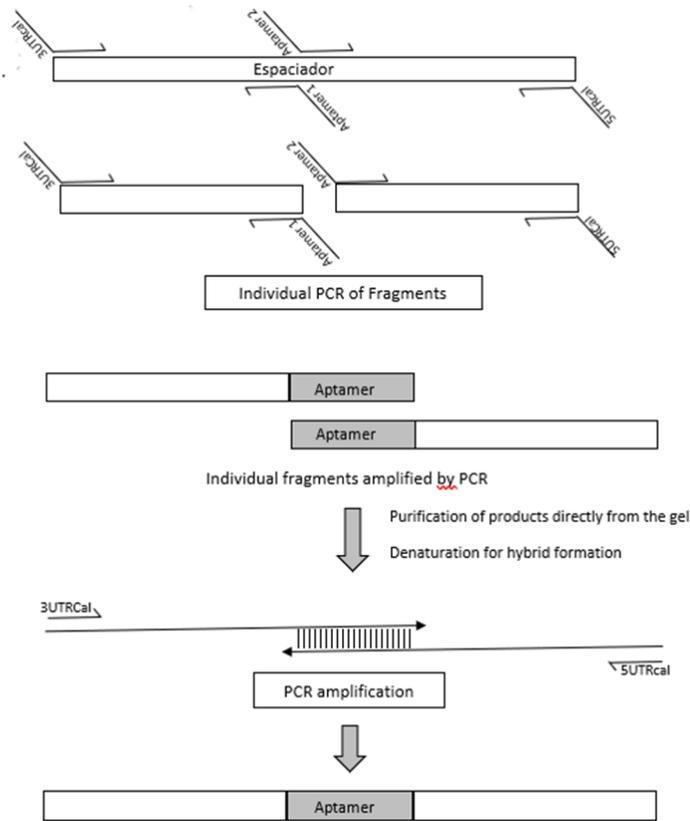


Figura 16. Método utilizado para insertar Aptámero S1 en las bases 312 y 492 del espaciador menor de calmodulina mediante PCR recursiva.

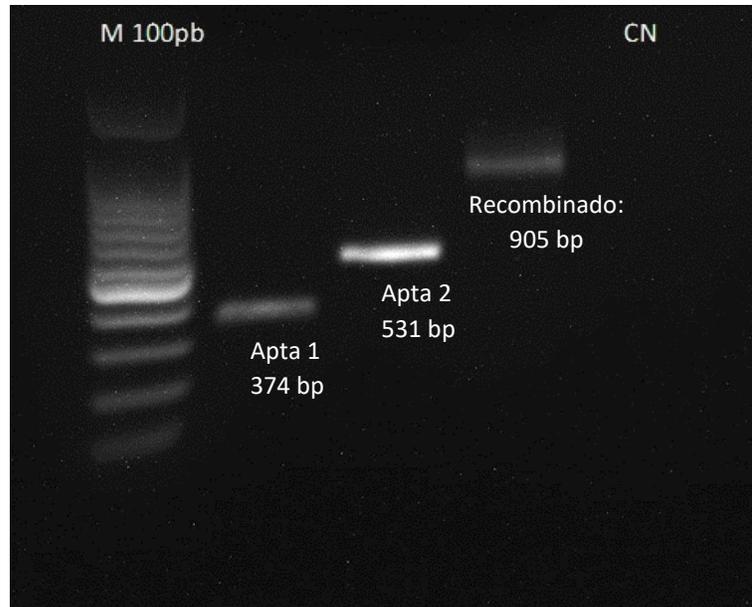


Figura 17. Productos de PCR obtenidos por la PCR recursiva. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; Apta1: amplicón aguas abajo; Apta2: amplicón corriente arriba; Recombinado: producto de amplificación obtenido por recombinación.

## **Detección de Proteínas que se unen al espaciador menor de calmodulina**

### **Transcripción in vitro**

Los resultados de la transcripción in vitro los podemos apreciar en la figura 18. Se muestran 3 transcritos (**C**) corresponde al control usado en la transcripción, (**R**) corresponde al transcrito sintético en el cual esta incorporado el ARNm del espaciador menor de calmodulina y el aptámero de alta afinidad a estreptavidina y el (**A**) corresponde a un transcrito control el cual incluye parte de la región promotora T7 del plásmido PGEM t easy y la secuencia del aptámero. Comparándolos con un marcador molecular podemos apreciar que el transcrito R corresponde en pares de base al amplicón sintético diseñado previamente por PCR recursivo. En la figura 19 podemos apreciar el resultado de la purificación de los transcritos, eliminando el ADN molde y los nucleótidos no incorporados.

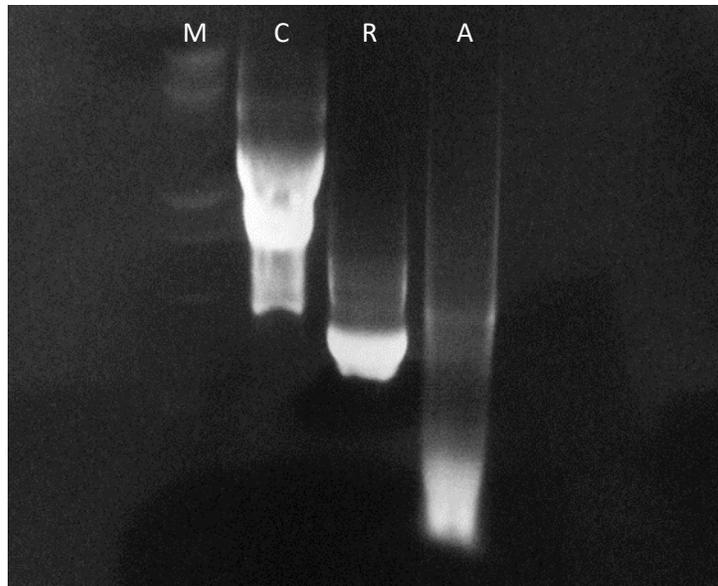


Figura 18. Productos obtenidos mediante transcripción in vitro. M= Marcador de peso molecular; C= Transcripto control; R= Transcripto Recombinado; A= Transcripto del Aptámero, control.

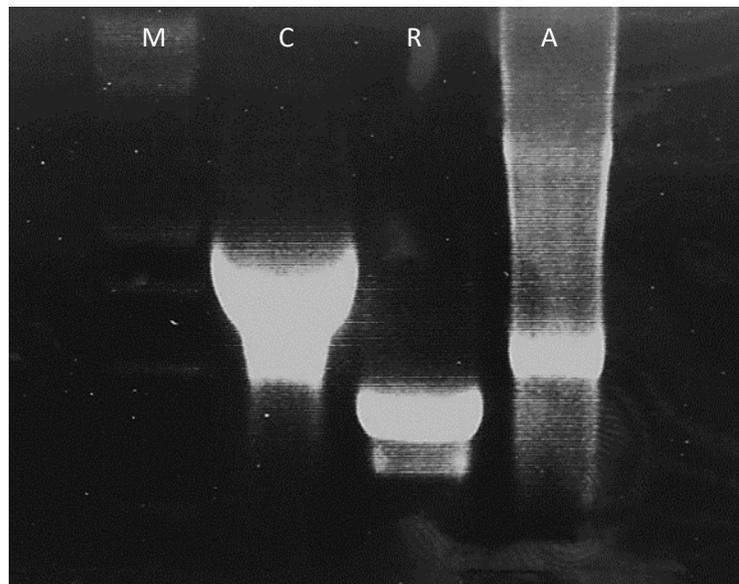


Figura 19. Purificación con el kit MEGAclear™ Kit (ThermoFisher Scientific) de los productos obtenidos por transcripción in vitro. M= Marcador de peso molecular; C= Transcripto control; R= Transcripto Recombinado; A= Transcripto del Aptámero, control.

### **Extracto celular de *T. cruzi***

Los cultivos de *T. cruzi* en su fase exponencial fueron utilizados para lograr obtener los extractos celulares. En la figura 20 se muestra el lisado del tratamiento con M-PER, en el transcurso de 15 minutos utilizando un baño ultrasónico modelo Shield Ultrasonic SC-035 para aumentar el rendimiento de las proteínas obteniendo una lisis completa de los parásitos. Posteriormente al lisado celular realizamos una electroforesis de proteínas SDS page (figura 21) para determinar el perfil de proteínas de *T. cruzi*.

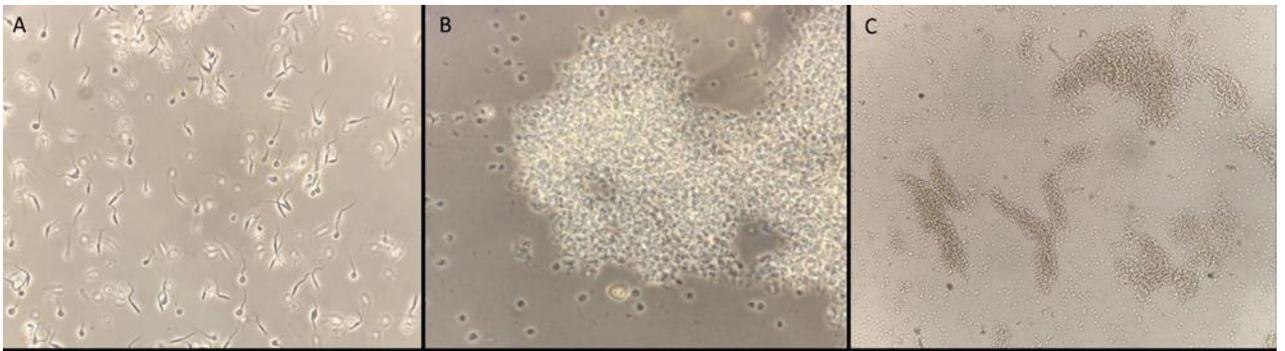


Figura 20. Tratamiento con M-PER (ThermoFisher Scientific) y Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (ThermoFisher Scientific). A= Células de *T. cruzi* en fase exponencial; B= Células de *T. cruzi* expuestas al tratamiento de M-PER; C= Resultado de la lisis celular.

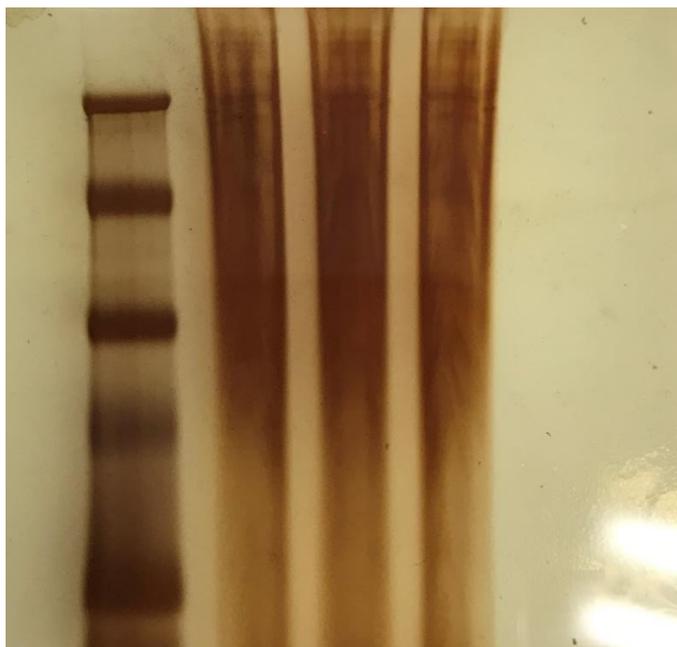


Figura 21. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el perfil de proteínas de *T. cruzi* del extracto celular. **Captura de las proteínas que se unen al espaciador por RNA-Pull Down:**

Los resultados de Pull Down se visualizaron por medio de una electroforesis de proteína SDS-PAGE, empleando el sistema de electroforesis mini-PROTEAN II de BIO-RAD y donde confeccionamos los geles de 12% de acrilamida en función del peso molecular de las proteínas que se iban a visualizar. En la estandarización se realizaron una serie de lavados para lograr obtener solo aquellas proteínas de alta afinidad a nuestra secuencia sintética de ARN, en esta estandarización podemos observar la figura 22, la cual presenta un lavado inicial y se apreciaban una gran cantidad de bandas equivalente a las diferentes proteínas entre ellas no afines al ARNm sintético. En la figura 23 podemos apreciar un pull down con dos lavados, aun estos resultados muestran abundantes proteínas posiblemente no afines a la secuencia sintética, por tal motivo realizamos un tercer lavado (figura 24) donde se aprecia un perfil marcado de proteínas y disminuyen las proteínas no específicas del ARNm sintético. Posteriormente se realizaron cuatro, cinco y seis lavados (figura 25, 26, 27), a medida que iban aumentando los lavados después del tercer lavado se iban perdiendo los perfiles de proteínas, por lo tanto con tres lavados

concentraos en un concentrador plus vacufuge marca Eppendorf estos resultados se muestran en la figura 28.



Figura 22. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar los resultados de Pull Down posterior a un lavado con el tampón de lavado de ARN.



Figura 23. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a dos lavados con el tapón de lavado de ARN.



Figura 24. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a tres lavados con el tapón de lavado de ARN.



Figura 25. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a cuatro lavados con el tapón de lavado de ARN.

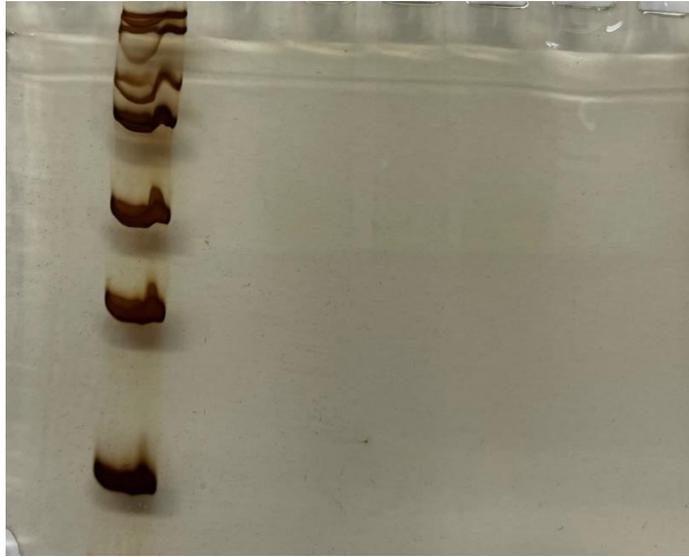


Figura 26. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a cinco lavados con el tapón de lavado de ARN.

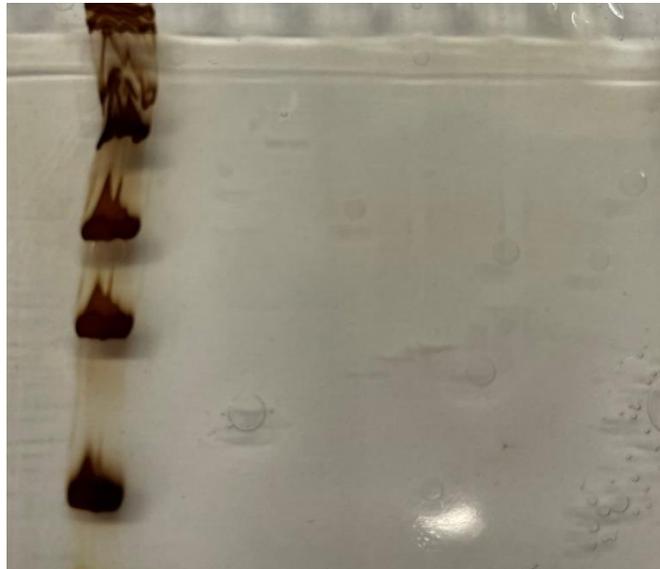


Figura 27. Gel al 12% teñido con tinción de plata para observar el los resultados de Pull Down posterior a seis lavados con el tapón de lavado de ARN.

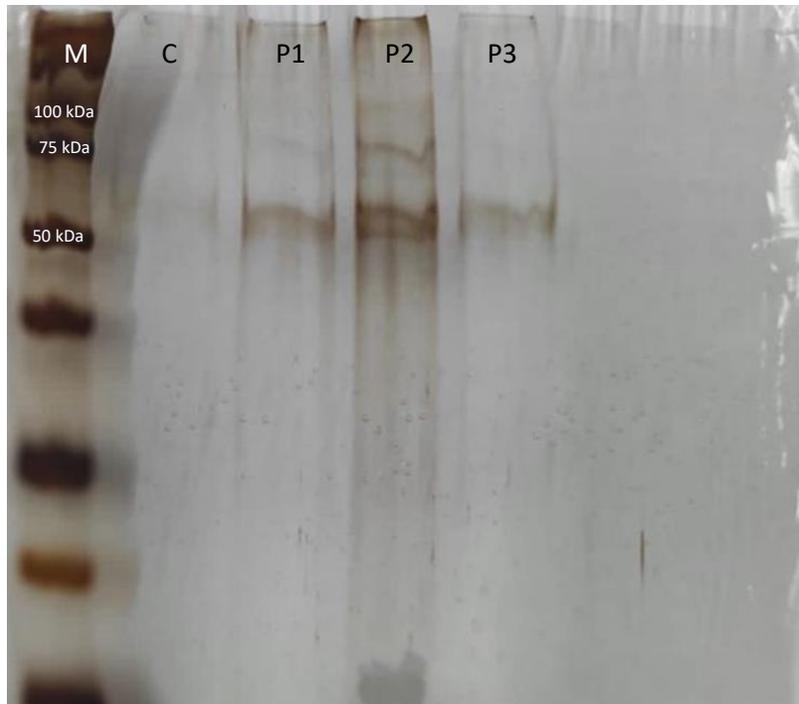


Figura 28. Resultados de la concentración de proteínas posterior al pull down con tres lavados de tapón de lavado ARN. Posterior al Pull Down se concentraron las proteínas en alícuotas de 200 uL en un equipo Concentrator plus/Vacufuge® plus – Eppendorf, para mejorar su visualización en el gel de poliacrilamida.

## CAPITULO V

### DISCUSIÓN

La homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  es vital para todos los organismos por lo que proteínas implicadas en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en parásitos se consideran objetivos quimioterapéuticos potenciales para la búsqueda de nuevos tratamientos de enfermedades parasitarias que ejerzan su acción a través de la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Benaim & Garcia, 2011). La alta concentración intracelular de este catión suele provocar la muerte celular, mientras en bajas concentraciones intracelulares participa en la transducción de señales y la activación de algunas enzimas (Zhivotovsky & Orrenius, 2011).

La calmodulina es una pequeña molécula proteica ubicua implicada en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual regula la actividad de la bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA), esta proteína

es uno de los principales transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , responsable del mantenimiento de la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel submicromolar en eucariotas (Di Leva *et al.*, 2008). Siendo calmodulina una de las principales proteínas implicadas en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  hemos decidido capturar proteínas que participen en la regulación de la expresión genética de la misma, sabiendo que en parásitos como *T. cruzi* la expresión genética es postranscripcional, por lo tanto, posibles moléculas proteicas encontrada en la regulación de Calmodulina en *T. cruzi* solo estarán relacionadas a este grupo de organismos Protozoos parasitarios, por lo que sería blancos moleculares específicos para el desarrollo de nuevos fármacos.

Para la captura de estas proteínas hemos empleado un ensayo pull down el cual consistió en diseñar un ARN sintético del espaciador menor del locus de calmodulina (EMLC) unido a un aptámero de alta afinidad a estreptavidina con el fin de capturar solo aquellas proteínas que tengan dominios afines al ARN transcrito del EMLC, para el desarrollo de este estudio comenzamos con el diseño in silico del EMLC. Su estructura nativa se presenta en la figura 14 en la cual se muestra el ARN transcrito y los motivos de uniones a proteínas, esta figura es el resultado de la predicción del software Mfold versión 2.3 (Zuker, 2003).

La captura de las proteínas afines a la región transcrita del EMLC en los ensayos pull down se ve facilitada por una etiqueta de afinidad de ARN altamente específica que permite la recuperación selectiva de todas las proteínas asociadas con el ARN etiquetado en condiciones no desnaturalizantes. Sin embargo, se han identificado relativamente pocas etiquetas de afinidad de ARN. En investigaciones anteriores han desarrollado ejemplos de etiquetas como la estructura de horquilla de ARN específica que se une a la proteína de la cubierta del bacteriófago MS2, las horquillas "boxB" nacientes de los bacteriófagos  $\lambda$  y P22, "StreptoTag" que se une a la estreptomycinina (Bachler *et al.*, 1999; Windbichler & Schroeder, 2006), el aptámero de ARN J6f1 que se une a la tobramicina (Hartmuth *et al.*, 2004) Aptámero de ARN ENREF 6 y S1 que se une a la estreptavidina (Srisawat & Engelke, 2001). El aptámero S1 fue el que decidimos utilizar en nuestro ensayo por la facilidad que nos brinda la biotina para eluirlo de la estreptavidina por competitividad demostrado en ensayos realizados y publicados anteriormente por Srisawat y Engelke (Srisawat & Engelke, 2001).

Posteriormente a la escogencia de la etiqueta del aptámero S1 tuvimos la tarea de incorporarlo a la estructura secundaria RNA del espaciador menor de calmodulina, sin perturbar su estructura

nativa, con la ayuda del software Mfold versión 2.3, realizamos la incorporación in silicio del aptámero S1 al espaciador menor de calmodulina, en la figura 15 se aprecia como quedó el aptámero S1 sin causar modificaciones a la estructura RNA del espaciador menor de calmodulina. Otros autores como (Bunka *et al.*, 2011) han utilizado este software para analizar el plegamiento de los ARN, dando resultados considerable sobre la estructura nativa de estas moléculas.

Después de esta evaluación primaria, diseñamos un enfoque de PCR basado en una PCR recursiva para el diseño de un gen sintético, método descrito por primera vez por (Walker *et al.*, 2008). Para el diseño de la PCR recursiva utilizamos la estructura generada con el software Mfold (figura 15) identificando todos los elementos del locus de calmodulina, diseñamos los conjuntos de cebadores (tabla 1) necesarios para agregar el aptámero S1 en el espaciador menor de calmodulina utilizando el paquete bioinformático UGENE versión 1.32.0. (Okonechnikov *et al.*, 2012).

Los resultados finales de la PCR recursiva los podemos observar en la figura 17, dos fragmentos iniciales (Apta 1= 334 pb y Apta 2= 531 pb) y un fragmento recombinado entre apta 1 y 2 que es de 905 pb, este último representa el espaciador menor del locus de calmodulina junto con el aptámero S1. Este fragmento recombinado se purifico para posteriormente ser transcrito y utilizado como anzuelo de captura de proteínas. La PCR recursiva se pudo utilizar para construir ADN largo de doble cadena a partir del conjunto de cebadores apropiadas. Este método recibe su nombre por su similitud con la recursividad en las aplicaciones de matemáticas e informática. La PCR recursiva también se denomina PCR de ensamblaje (Stemmer *et al.*, 1995), ensamblaje de superposición paralela (Ouyang *et al.*, 1997) o ensamblaje de ciclos de polimerasa (Smith *et al.*, 2003). La PCR recursiva tiene ventajas como: (i) síntesis en un solo recipiente, (ii) un solo producto dominante, (iii) velocidad: a menudo requiere menos de un día, (iv) eficiencia material: la síntesis química requiere solo la mitad del producto de ADN dúplex (Xiong *et al.*, 2004). Lo que nos facilitó la síntesis de nuestro gen sintético.

La amplificación del gen sintético realizada por PCR recursiva fue confirmada mediante una secuenciación Sanger donde el archivo fue recibido en formato ABI y se visualizó en el programa UGEN Posteriormente se llevó a cabo una búsqueda de la secuencia del espaciador

menor de calmodulina y la secuencia del aptámero dando resultado arriba del 90% de identidad de la secuencia que buscamos.

Teniendo el amplicón de nuestro gen sintético el paso siguiente fue realizar una transcripción in vitro (figura 18) y purificación de los transcritos (figura 19) para posteriormente obtener el ARN transcrito del EMLC.

Como es un ARN sintético marcada con el aptámero S1 y utilizado en el ensayo de captura de proteínas, utilizamos como control de captura la transcripción del aptámero S1 sin la secuencia del espaciador menor de calmodulina. En la figura 19 está representado el transcrito con la banda (A) el cual es el transcrito del aptámero S1 y banda (R) representa el transcrito recombinado del espaciador menor más el aptámero S1. Los ARN sintéticos se puede sintetizar a través de la transcripción in vitro a partir de un molde de ADNc con (p. ej., SP6 o T7) (Yisraeli and Melton 1989). Agregarle un promotor T7 a nuestra secuencia sintética nos facilitó la síntesis de nuestro ARN de captura.

Para desarrollar el pul down utilizamos el lisado de *T. cruzi* (figura 20) y como anzuelo de captura de proteínas se utilizó el ARN sintético recombinado y el control el ARN sintético del aptámero, esto permitió capturar proteínas afines al transcripto del espaciador menor de calmodulina, uno de los pasos fundamental en los ensayos pull down es el lavado o eliminación de proteínas no afines a las regiones. Nosotros ensayamos desde un lavado hasta seis lavados (figura 22-27), en los cuales con tres lavados mostros mejor resultados en los geles de SDS-Page. Otros autores como (Scherer *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2015) en sus investigaciones de proteínas de unión a ARN también han aplicado tres lavados y han tenido buenos resultados.

En la figura 28 se puede apreciar el resultado de la tinción de plata para los pull down (P1, P2 y P3), concentrados en un concentrator plus/vacufuge® plus – Eppendorf, en esta figura las bandas de proteínas se ven mas evidente y podemos apreciar un patrón de banda en el control de captura (ARN transcrito del aptámero S1) y en los ensayos con el transcrito de interés (ARN recombinado). Este patrón que no se pudo eliminar mediante los lavados posiblemente se trate a la estreptavidina restante ya que se encuentra según el marcador molecular posterior a los 50 kDa y la misma tiene un peso de 52,8 kDa.

Las otras bandas observadas (Figura 28, P1, P2 y P3) posiblemente sean proteínas capturadas que participan en la regulación de la expresión genética de calmodulina uniéndose al transcripto del EMLC. En el 2018 Ruiz et al. utilizaron ensayos pull down para identificar y caracterizar proteínas que participan en la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos, específicamente proteínas implicadas en la regulación posterior a la transcripción de los genes HSP70 de *Leishmania braziliensis* (Ruiz et al., 2018). A diferencia de su trabajo nosotros solamente capturamos las proteínas afines a la región transcrita del EMLC, estas proteínas posteriormente serán secuenciadas, analizadas y caracterizadas.

El pull down puede utilizarse para encontrar la secuencia de ARN con la que interactúa las proteínas de unión al ARN. Además, este método permite la identificación de todas las proteínas que interactúan con el ARN si la metodología es seguida por espectrometría de masas. En resumen, este método puede identificar con éxito la interacción de una proteína endógena (o recombinante) con ARNs de interés sintetizados in vitro (Panda et al., 2016).

Los resultados encontrados nos permitieron capturar proteínas afines al EMLC, para poder identificar y caracterizar estas proteínas será necesario realizar una secuenciación de proteínas y posteriores análisis bioinformáticos.

## CAPITULO IV

### CONCLUSION

Desarrollamos una metodología que nos permitió captura y aislar proteínas ligantes que se unen a elementos de secuencias del espaciador menor del locus de calmodulina de *T. cruzi*. La misma representa una herramienta útil para el estudio interacción proteína-ARN entre motivos de secuencia y proteínas diana involucradas en importantes funciones biológicas esenciales para la supervivencia de *T. cruzi*.

Para el desarrollo de esta metodología tuvimos que amplificar el espaciador menor del locus de calmodulina de *T. cruzi*, posteriormente diseñar un PCR recursiva para incorporar la secuencia de ADN de un aptámero S1 de alta afinidad a estreptavidina a la secuencia de ADN del espaciador menor de calmodulina sin perturbar el transcripto generado naturalmente. Con el diseño establecido transcribimos el espaciador menor de calmodulina, junto al aptámero de alta afinidad a estreptavidina, lo que permitió utilizar este transcripto como anzuelo de captura de proteínas en un ensayo pull down.

### PERSPECTIVA

- Secuenciar las proteínas capturada con la metodología Pull Down.
- Utilizar la misma metodología en los diferentes estadios del parasito.
- Separar el núcleo del citoplasma de *T. cruzi* por ultra centrifugación y trabajar con estos componentes por separados.
- Diseñar una estrategia que permita encontrar moléculas que intercalen con las proteínas aisladas como futuro prometededor de dianas y compuestos terapéuticos.

## REFERENCIAS

- Acquatella, H. (2007). Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation*, *115*(9), 1124–1131. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627323>
- Agabian, N. (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*, *61*(7), 1157–1160. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90674-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90674-4)
- Alves, L. R., Guerra-Slompo, E. P., de Oliveira, A. V, Malgarin, J. S., Goldenberg, S., & Dallagiovanna, B. (2013). mRNA localization mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, *8*(12), e81375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081375>
- Alviarez, Y., Lares, M., Vietri, M., Aguilar, C. M., Herrera, L., & Ferrer, E. (2014). Estandarización de la técnica de aglutinación directa para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Biomedica*, *34*(2), 308–317. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.2078>
- Andrade, J. P., Marin, J. A., Vicenzo, A., Vilas-Boas, F., Moraes, G. M., Bacal, F., Bocchi, E., Rodrigues, D., Fragata, A., Viera, M., Salles, S., Oliviera, W., & Pito, J. (2011). I diretriz latino-americana para o diagnóstico e tratamento da cardiopatia chagásica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, *97*(2 SUPPL. 1), 1–53. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2011001600001>
- Andrade, S. G. (1982). The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *76*(1), 123–128. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(82\)90036-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(82)90036-0)
- Araújo, P. R., & Teixeira, S. M. (2011). Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(3), 257–266. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000300002>
- Arner, E., Kindlund, E., Nilsson, D., Farzana, F., Ferella, M., Tammi, M. T., & Andersson, B. (2007). Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20 000 additional gene variants. *BMC Genomics*, *8*(1), 391. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-391>
- Ash, C., & Jasny, B. R. (2005). Trypanosomatid genomes. *Science*, *309*(5733), 399–400.

<https://doi.org/10.1126/science.309.5733.399>

Azogue, E., & Darras, C. (1991). Prospective study of Chagas disease in newborn children with placental infection caused by *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia). *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24(2), 105–109.

<https://doi.org/10.1590/s0037-86821991000200007>

Bachler, M., Schroeder, R., & von Ahsen, U. (1999). StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins. *RNA (New York, N.Y.)*, 5(11), 1509–1516.

<https://doi.org/10.1017/s1355838299991574>

Balagopal, V., & Parker, R. (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 403–408.

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.005>

Bangs, J. D., Crain, P. F., Hashizume, T., McCloskey, J. A., & Boothroyd, J. C. (1992). Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9805–9815.

Barbosa, P. (2006). The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology*, 112(1), 132–133.

<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.11.087>

Barcán, L., Lunaó, C., Clara, L., Sinagra, A., Valledor, A., De Rissioí, A. M., Gadanoá, A., García, M. M., de Santibañes, E., & Riarte, A. (2005). Transmission of *T. Cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chaga's disease. *Liver Transplantation*, 11(9), 1112–1116.

<https://doi.org/10.1002/lt.20522>

Barros, M. V. L., Da Costa Rocha, M. O., Ribeiro, A. L. P., & Santana Machado, F. (2001).

Tissue doppler imaging enables the identification of diastolic dysfunction of pseudonormal pattern in chagas' disease. *Journal of the American Society of Echocardiography*, 14(5), 353–359.

<https://doi.org/10.1067/mje.2001.111155>

Bartholomeu, D. C., Cerqueira, G. C., Leão, A. C. A., daRocha, W. D., Pais, F. S., Macedo, C., Djikeng, A., Teixeira, S. M. R., & El-Sayed, N. M. (2009). Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human

- pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3407–3417.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkp172>
- Benaim, B. G., & Garcia, C. R. S. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. *Tropical Biomedicine*, 28(3), 471–481.
- Benaim, G. (1996). Intracellular calcium regulation and signaling in *Leishmania*. *Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis*, 89–106.
- Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R., & Moreno, S. N. (1993). A calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pump in plasma-membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*; selective inhibition by pentamidine. *The Biochemical Journal*, 296 ( Pt 3(Pt 3)), 759–763.  
<https://doi.org/10.1042/bj2960759>
- Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F. R., & Docampo, R. (1991). A calmodulin-activated (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase is involved in Ca<sup>2+</sup> transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 280(3), 715–720.  
<https://doi.org/10.1042/bj2800715>
- Benaim, G., Moreno, S. N., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, P. J., Ruiz, F., de Souza, W., & Docampo, R. (1995). Characterization of the plasma-membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal*, 306 ( Pt 1(Pt 1)), 299–303.  
<https://doi.org/10.1042/bj3060299>
- Benaim, G., & Romero, P. J. (1990). A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1027(1), 79–84.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90051-o](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90051-o)
- Benaim, G., & Villalobo, A. (2002). Phosphorylation of calmodulin. Functional implications. *European Journal of Biochemistry*, 269(15), 3619–3631. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03038.x>
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 365(13), 1258–1259. <https://doi.org/10.1056/nejmc1108653>
- Bern, C. (2012). Chagas disease in the immunosuppressed host. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(4), 450–457. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328354f179>

- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). Trypanosoma cruzi and chagas' disease in the united states. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 655–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>
- Bern, C., Martin, D. L., & Gilman, R. H. (2011). Acute and Congenital Chagas Disease. In *Advances in Parasitology* (1st ed., Vol. 75). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>
- Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Marin-neto, J. A., Maguire, J. H., Acquatella, H., Morillo, C., Gilman, R. H., Reyes, P. A., & Salvatella, R. (2007). Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. *Journal of the American Medical Association*, 298(18), 2171–2181. <http://jama.jamanetwork.com/>
- Bern, C., Verastegui, M., Gilman, R. H., LaFuente, C., Galdos-Cardenas, G., Calderon, M., Pacori, J., Del Carmen Abastoflor, M., Aparicio, H., Brady, M. F., Ferrufino, L., Angulo, N., Marcus, S., Sterling, C., & Maguire, J. H. (2009). Congenital Trypanosoma cruzi Transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1667–1674. <https://doi.org/10.1086/648070>
- Berná, L., Chiribao, M. L., Greif, G., Rodriguez, M., Alvarez-Valin, F., & Robello, C. (2017). Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in Trypanosoma cruzi. *PeerJ*, 5, e3017. <https://doi.org/10.7717/peerj.3017>
- Berná, L., Rodriguez, M., Chiribao, M. L., Parodi-Talice, A., Pita, S., Rijo, G., Alvarez-Valin, F., & Robello, C. (2018). Expanding an expanded genome: long-read sequencing of Trypanosoma cruzi. *Microbial Genomics*, 4(5). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000177>
- Berrizbeitia, M. (2013). ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN / SECRECIÓN DE TRIPOMASTIGOTES DE Trypanosoma cruzi ( TESA ) COMO HERRAMIENTAS ÚTILES PARA EL. 25, 346–357.
- Bonay, P., & Fresno, M. (1995). Characterization of carbohydrate binding proteins in Trypanosoma cruzi. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(19), 11062–11070. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.19.11062>

- Brandão, A., & Fernandes, O. (2006). Trypanosoma cruzi: Mutations in the 3' untranslated region of calmodulin gene are specific for lineages T. cruzi I, T. cruzi II, and the Zymodeme III isolates. *Experimental Parasitology*, *112*(4), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.11.011>
- Brandao, A., Samudio, F., Fernandes, O., Calzada, J. E., & Sousa, O. E. (2008). Genotyping of Panamanian Trypanosoma cruzi stocks using the calmodulin 3' UTR polymorphisms. *Parasitology Research*, *102*(3), 523–526.
- Brasil, P. E. A. A., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A. M., Sangenis, L. H. C., & Braga, J. U. (2010). ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-337>
- Brenière, S. F., Waleckx, E., & Barnabé, C. (2016). Over six thousand Trypanosoma cruzi strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(8), e0004792.
- Briones, M. R. S., Souto, R. P., Stolf, B. S., & Zingales, B. (1999). The evolution of two Trypanosoma cruzi subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *104*(2), 219–232. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(99\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(99)00155-3)
- Brisse, S., Dujardin, J. C., & Tibayrenc, M. (2000). Identification of six Trypanosoma cruzi lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *111*(1), 95–105. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00302-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00302-9)
- Britto, C. C. (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(SUPPL. 1), 122–135. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900018>
- Bunka, D. H. J., Lane, S. W., Lane, C. L., Dykeman, E. C., Ford, R. J., Barker, A. M., Twarock, R., Phillips, S. E. V., & Stockley, P. G. (2011). Degenerate RNA Packaging Signals in the Genome of Satellite Tobacco Necrosis Virus: Implications for the

- Assembly of a T=1 Capsid. *Journal of Molecular Biology*, 413(1), 51–65.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.063>
- Butter, F., Scheibe, M., Mörl, M., & Mann, M. (2009). Unbiased RNA-protein interaction screen by quantitative proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(26), 10626–10631.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812099106>
- Callejas-Hernández, F., Rastrojo, A., Poveda, C., Gironès, N., & Fresno, M. (2018). Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. *Scientific Reports*, 8(1), 14631. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32877-2>
- Calzada, J. E., Samudio, F., de Juncá, C., Pineda, V., Burleigh, B. A., & Saldaña, A. (2022). Genetic Diversity of *Trypanosoma cruzi* in Panama Inferred by Multi-locus Sequence Typing of Mitochondrial Genes. *Microorganisms*, 10(2).  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020287>
- Camargo, P. (1964). *GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI!*
- Campbell, D., Westenberger, S., & Sturm, N. (2005). The Determinants of Chagas Disease: Connecting Parasite and Host Genetics. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 549–562.  
<https://doi.org/10.2174/1566524043360249>
- Cançado, J. R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(1), 29–37.  
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000100006>
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., & Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(2), 107–260. <https://doi.org/10.1080/20014091074183>
- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J., & Vázquez, M. P. (2005). Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of *Trypanosoma cruzi*: implications for their functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(3), 1017–1025. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.007>

- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J., & Vázquez, M. P. (2006). Trypanosoma cruzi: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family. *Experimental Parasitology*, *113*(2), 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.12.015>
- Cassola, A., De Gaudenzi, J. G., & Frasch, A. C. (2007). Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Molecular Microbiology*, *65*(3), 655–670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05833.x>
- Cassola, A., & Frasch, A. C. (2009). An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(50), 35015–35028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.031633>
- CDC. (2021). *American Trypanosomiasis*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
- Chagas, C. (1909). *Chagas 1909.pdf*.
- Chen, C.-Y. A., & Shyu, A.-B. (2010). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, *2*(2), 167–183. <https://doi.org/10.1002/wrna.40>
- Cheung, W. Y. (1980). Calmodulin Plays. *Proteins*, *1960*(1971), 19–27.
- Chin-Hong, P. V., Schwartz, B. S., Bern, C., Montgomery, S. P., Kontak, S., Kubak, B., Morris, M. I., Nowicki, M., Wright, C., & Ison, M. G. (2011). Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: Recommendations from the chagas in transplant working group. *American Journal of Transplantation*, *11*(4), 672–680. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03444.x>
- Chin, D., & Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*, *10*(8), 322–328. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)01800-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)01800-6)
- Chung, S. H., & Swindle, J. (1990). Linkage of the calmodulin and ubiquitin loci in trypanosoma cruzi. *Nucleic Acids Research*, *18*(15), 4561–4569. <https://doi.org/10.1093/nar/18.15.4561>
- Clayton, C. E. (2002a). *ClaytonCE\_2002\_transcription\_control\_tcruzi*. *21*(8), 1–8.

sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop\_files/info/biologia/parasitas/cruzi/transcription\_cruzi/ClaytonCE\_2002\_transcription\_control\_tcruci.pdf%5Cpapers2://publication/uuid/B6F2B749-DDDB-4129-B994-A40960E79695

- Clayton, C. E. (2002b). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal*, 21(8), 1881–1888. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.1881>
- Clayton, C. E. (2013). *Nfunote*. 21(8), 1–3. [papers2://publication/uuid/715AFDA2-703D-4421-B480-321474CFB157](https://papers2://publication/uuid/715AFDA2-703D-4421-B480-321474CFB157)
- Clayton, C. E. (2014). Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(2), 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.005>
- Clayton, C., Schwede, A., Stewart, M., Robles, A., Benz, C., Po, J., Wurst, M., Queiroz, R., & Archer, S. (2008). Control of mRNA degradation in trypanosomes. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 3), 520–521. <https://doi.org/10.1042/BST0360520>
- Clayton, C., & Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(2), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.007>
- Coller, J. M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., & Parker, R. (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(12), 1717–1727. <https://doi.org/10.1017/s135583820101994x>
- Coller, J., & Parker, R. (2004). Eukaryotic mRNA decapping. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 861–890. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074032>
- Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, 115(1–2), 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.008>
- Coura, J. R., Junqueira, A. C. V., Fernandes, O., Valente, S. A. S., & Miles, M. A. (2002). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology*, 18(4), 171–176. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02200-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02200-0)

- Crowther, G. J., Shanmugam, D., Carmona, S. J., Doyle, M. A., Hertz-Fowler, C., Berriman, M., Nwaka, S., Ralph, S. A., Roos, D. S., van Voorhis, W. C., & Agüero, F. (2010). Identification of attractive drug targets in neglected- disease pathogens using an in Silico approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000804>
- D'Orso, I., De Gaudenzi, J. G., & Frasch, A. C. C. (2003). RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends in Parasitology*, 19(4), 151–155.  
[https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00035-7)
- D'Orso, I., & Frasch, A. C. C. (2001). TcUBP-1, a Developmentally Regulated U-rich RNA-binding Protein Involved in Selective mRNA Destabilization in Trypanosomes\*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34801–34809.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M102120200>
- D'Orso, I., & Frasch, A. C. C. (2002). TcUBP-1, an mRNA Destabilizing Factor from Trypanosomes, Homodimerizes and Interacts with Novel AU-rich Element- and Poly(A)-binding Proteins Forming a Ribonucleoprotein Complex\*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50520–50528.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M209092200>
- Da Silva Augusto, L., Moretti, N. S., Ramos, T. C. P., de Jesus, T. C. L., Zhang, M., Castilho, B. A., & Schenkman, S. (2015). A membrane-bound eIF2 alpha kinase located in endosomes is regulated by heme and controls differentiation and ROS levels in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 11(2), e1004618.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004618>
- Dallagiovanna, B., Correa, A., Probst, C. M., Holetz, F., Smircich, P., de Aguiar, A. M., Mansur, F., da Silva, C. V., Mortara, R. A., Garat, B., Buck, G. A., Goldenberg, S., & Krieger, M. A. (2008). Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8266–8273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703097200>
- Dallagiovanna, B., Pérez, L., Sotelo-Silveira, J., Smircich, P., Duhagon, M. A., & Garat, B. (2005). *Trypanosoma cruzi*: molecular characterization of TcPUF6, a Pumilio protein.

*Experimental Parasitology*, 109(4), 260–264.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.01.003>

Dantas, A. P., Barbosa, H. S., & De Castro, S. L. (2003). Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 35(3), 287–294.

Das, A., Banday, M., Fisher, M. A., Chang, Y. J., Rosenfeld, J., & Bellofatto, V. (2017). An essential domain of an early-diverged RNA polymerase II functions to accurately decode a primitive chromatin landscape. *Nucleic Acids Research*, 45(13), 7886–78896.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkx486>

Das, A., Zhang, Q., Palenchar, J. B., Chatterjee, B., Cross, G. A. M., & Bellofatto, V. (2005). Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7314–7322.

<https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7314-7322.2005>

De Gaudenzi, J., Frasch, A. C., & Clayton, C. (2005). RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis. *Eukaryotic Cell*, 4(12), 2106–2114.

<https://doi.org/10.1128/EC.4.12.2106-2114.2005>

De Gaudenzi, J. G., D’Orso, I., & Frasch, A. C. C. (2003). RNA recognition motif-type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 18884–18894.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M301756200>

De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasch, A. C., & Cassola, A. (2011). Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays in Biochemistry*, 51(1), 31–46.

<https://doi.org/10.1042/BSE0510031>

De Pablos, L. M., & Osuna, A. (2012). Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infection and Immunity*, 80(7), 2258–2264.

<https://doi.org/10.1128/IAI.06225-11>

De Souza, W. De. (2002). *Kinetoplastid Biology and Disease From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids : dreams and*

*reality* . 21, 1–21.

- Delhi, P., Queiroz, R., Inchaustegui, D., Carrington, M., & Clayton, C. (2011). Is there a classical nonsense-mediated decay pathway in trypanosomes? *PloS One*, 6(9), e25112. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025112>
- Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D., & Carafoli, E. (2008). The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(1), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.026>
- Di Noia, J. M., D’Orso, I., Sánchez, D. O., & Frasch, A. C. (2000). AU-rich elements in the 3’-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10218–10227. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10218>
- Dias. (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas’ disease a clinical epidemiological review. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22(3), 147–156.
- Dias, J. C., & Schofield, C. J. (1998). The control of the transmission by transfusion of Chagas’ disease in the Southern Cone Initiative. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(4), 373–383. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821998000400007>
- Dias, J., & Macedo, V. (2005). Doença de Chagas. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 43(3), 495–581.
- Díaz de Toranzo, E. G., Castro, J. A., Franke de Cazzulo, B. M., & Cazzulo, J. J. (1988). Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 44(10), 880–881. <https://doi.org/10.1007/BF01941187>
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Dos Santos, S. L., Freitas, L. M., Lobo, F. P., Rodrigues-Luiz, G. F., Mendes, T. A. de O., Oliveira, A. C. S., Andrade, L. O., Chiari, E., Gazzinelli, R. T., & Teixeira, S. M. R.

- (2012). *The MASP family of Trypanosoma cruzi: changes in gene expression and antigenic profile during the acute phase of experimental infection.*
- Duhagon, M. A., Dallagiovanna, B., & Garat, B. (2001). Unusual features of poly[dT-dG].[dC-dA] stretches in CDS-flanking regions of Trypanosoma cruzi genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287 1, 98–103.
- Dujardin, J. P., Schofield, C. J., & Panzera, F. (2002). Los vectores de la Enfermedad de Chagas. In *Bruxelles : Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer* (Vol. 25, Issue 3).
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., & Séraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(1), 15–22. <https://doi.org/10.1038/nsmb1184>
- Eid, J. E., & Sollner-Webb, B. (1991). Homologous recombination in the tandem calmodulin genes of Trypanosoma brucei yields multiple products: compensation for deleterious deletions by gene amplification. *Genes & Development*, 5(11), 2024–2032. <https://doi.org/10.1101/gad.5.11.2024>
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E. A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D. C., Haas, B. J., Tran, A.-N., Wortman, J. R., Alsmark, U. C. M., Angiuoli, S., Anupama, A., ... Hall, N. (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), 404–409. <https://doi.org/10.1126/science.1112181>
- El-Sayed, N., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., ... Andersson, B. (2005). The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), 409–415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- Escalante, H., Jara, C., Davelois, K., Iglesias, M., Benites, A., & Espinoza, R. (2014). *Obtención de un reactivo de inmunoaglutinación para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi.* 31(4), 6–8.

- Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L., & Martínez, I. (2010). Mexican *Trypanosoma cruzi* T. cruzi I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 890672. <https://doi.org/10.1155/2010/890672>
- Ferraz, A., & Figueiredo, J. (1993). *FERRAZ, 1993.pdf*.
- Figueiredo, J. F. C., Martinez, R., da Costa, J. C., Neto, M. M., Saud, H. J., & Ferraz, A. S. (1990). Transmission of Chagas disease through renal transplantation: Report of a case. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(1), 61–62. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90383-P](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90383-P)
- Flores-Ferrer, A., Marcou, O., Waleckx, E., Dumonteil, E., & Gourbière, S. (2018). Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need? *Evolutionary Applications*, 11(4), 470–487. <https://doi.org/10.1111/eva.12582>
- Franks, T. M., & Lykke-Andersen, J. (2008). The control of mRNA decapping and P-body formation. *Molecular Cell*, 32(5), 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.001>
- Franzén, O., Ochaya, S., Sherwood, E., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Miles, M. A., & Andersson, B. (2011). Shotgun Sequencing Analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and Comparison with T. cruzi VI CL Brener. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000984>
- Franzén, O., Talavera-López, C., Ochaya, S., Butler, C. E., Messenger, L. A., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Marinkelle, C. J., Tyler, K. M., Miles, M. A., & Andersson, B. (2012). Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies T. cruzi marinkellei. *BMC Genomics*, 13, 531. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-531>
- Freilij, H., & Altcheh, J. (1995). Congenital chagas' disease: Diagnostic and clinical aspects. *Clinical Infectious Diseases*, 21(3), 551–555. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.3.551>
- Garcia-Alvarez, A., Sitges, M., Pinazo, M. J., Regueiro-Cueva, A., Posada, E., Poyatos, S., Ortiz-Pérez, J. T., Heras, M., Azqueta, M., Gascon, J., & Sanz, G. (2010). Chagas

- cardiomiopathy: The potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000826>
- Garcia, E. S., Genta, F. A., De Azambuja, P., & Schaub, G. A. (2010). Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*, 26(10), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.07.003>
- Garcia, V. (2011). *Obtención de un reactivo de inmunoaglutinación para el diagnóstico de la infección por Trypanosoma cruzi*.
- Gascon, J., Bern, C., & Pinazo, M. J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*, 115(1–2), 22–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>
- Goijman, S. G., & Stoppani, A. O. M. (1985). Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Pharmacology*, 34(8), 1331–1336. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90514-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90514-3)
- Gomez, C., Esther Ramirez, M., Calixto-Galvez, M., Medel, O., & Rodríguez, M. A. (2010). Regulation of gene expression in protozoa parasites. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 726045. <https://doi.org/10.1155/2010/726045>
- Gonzalez, N. S., & Cazzulo, J. J. (1989). Effects of trypanocidal drugs on protein biosynthesis in vitro and in vivo by *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Pharmacology*, 38(17), 2873–2877. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90444-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90444-9)
- Grisard, E. C., Teixeira, S. M. R., de Almeida, L. G. P., Stoco, P. H., Gerber, A. L., Talavera-López, C., Lima, O. C., Andersson, B., & de Vasconcelos, A. T. R. (2014). *Trypanosoma cruzi* Clone Dm28c Draft Genome Sequence. *Genome Announcements*, 2(1).  
<https://doi.org/10.1128/genomeA.01114-13>
- Guerra-Slombo, E. P., Probst, C. M., Pavoni, D. P., Goldenberg, S., Krieger, M. A., & Dallagiovanna, B. (2012). Molecular characterization of the *Trypanosoma cruzi* specific RNA binding protein TcRBP40 and its associated mRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2), 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.154>

- Gugliotta, J. L., Tanowitz, H. B., Wittner, M., & Soeiro, R. (1980). *cruzi* : Inhibition of Protein Nitrofurans by. 224, 216–224.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014489480901186>
- Günzl, A., Ullu, E., Dörner, M., Fragoso, S. P., Hoffmann, K. F., Milner, J. D., Morita, Y., Nguu, E. K., Vanacova, S., Wunsch, S., Dare, A. O., Kwon, H., & Tschudi, C. (1997). Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 85(1), 67–76. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(96\)02816-2](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02816-2)
- 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., Glaser, F., Mandel-Gutfreund, Y., & Michaeli, S. (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 Research*, 41(13), 6577–6594. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt369>
- Haile, S., Estevez, A. M., & Clayton, C. (2003). A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(12), 1491–1501.  
<https://doi.org/10.1261/rna.5940703>
- Hartmuth, K., Vornlocher, H.-P., & Lührmann, R. (2004). Tobramycin affinity tag purification of spliceosomes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 257, 47–64.  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-750-5:047>
- Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., & Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(5), 327–341.  
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>
- Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Rodriguez, P., Berthe, A., Torrico, F., & Carrier, Y. (2004). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- $\gamma$  in response to parasite antigens. *Journal of Infectious Diseases*, 189(7), 1274–1281.  
<https://doi.org/10.1086/382511>
- Herreros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). *Trypanosoma Cruzi* Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and

- Biological Implications. *Genes*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/genes11101196>
- Herwaldt, B. (2001). Stress in the Workplace: Meeting the Challenge. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 659–688. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.659>
- Heyneman, D., & Mc Kerrow, H. J. (1991). Parasitic Diseases In: Stites PD, Terr IA; eds. *Basic and Clinical Immunology*, 7, 672–681.
- Hoffmann, A., Jakob, M., & Ochsenreiter, T. (2016). A novel component of the mitochondrial genome segregation machinery in trypanosomes. *Microbial Cell*, 3(8), 352–354. <https://doi.org/10.15698/mic2016.08.519>
- Holetz, F. B., Correa, A., Avila, A. R., Nakamura, C. V., Krieger, M. A., & Goldenberg, S. (2007). Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(4), 1062–1067. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.104>
- Hotez, P., Bottazzi, M. E., Strub-Wourgaft, N., Sosa-Estani, S., Torrico, F., Paján, L., Abril, M., & Sancho, J. (2020). A new patient registry for Chagas disease. In *PLoS neglected tropical diseases* (Vol. 14, Issue 10, p. e0008418). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008418>
- Iantorno, S. A., Durrant, C., Khan, A., Sanders, M. J., Beverley, S. M., Warren, W. C., Berriman, M., Sacks, D. L., Cotton, J. A., & Grigg, M. E. (2017). Gene Expression in *Leishmania* Is Regulated Predominantly by Gene Dosage. *MBio*, 8(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01393-17>
- Jurberg J., G. C. (2006). *Biology , ecology , and systematics of Triatominae ( Heteroptera , Reduviidae ) , vectors of Chagas disease , and implications for human health 1. 50*, 1096–1116.
- Keene, J. D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews Genetics*, 8(7), 533–543. <https://doi.org/10.1038/nrg2111>
- Kissinger, J. C. (2006). A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends in Parasitology*, 22(6), 240–243. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.002>

- Klee, C. B., & Vanaman, T. C. (1982). Calmodulin. *Advances in Protein Chemistry*, 35, 213–321. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60470-2](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60470-2)
- Kollien, A. H., & Schaub, G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 16(9), 381–387. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(00\)01724-5](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01724-5)
- Kooter, J. M., & Borst, P. (1984). Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Research*, 12(24), 9457–9472. <https://doi.org/10.1093/nar/12.24.9457>
- Kowalska, A., Kowalski, P., & Torres, M. (2009). American trypanosomiasis (chagas disease). *Medical Parasitology*, 154–160. <https://doi.org/10.1201/9781498713672-34>
- Kramer, S. (2012). Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181(2), 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.002>
- Kramer, S., & Carrington, M. (2011). Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, 27(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.011>
- Kramer, S., Queiroz, R., Ellis, L., Hoheisel, J. D., Clayton, C., & Carrington, M. (2010). The RNA helicase DHH1 is central to the correct expression of many developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 5), 699–711. <https://doi.org/10.1242/jcs.058511>
- Krogstad, D. J. (1994). Protozoarios de la sangre y los tejidos. *Schaechter M, Medoff G, Eisenstein B, Guerra H. Microbiología. Mecanismos de Las Enfermedades Infecciosas. 2ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana*, 630–649.
- Kun, H., Moore, A., Mascola, L., Steurer, F., Lawrence, G., Kubak, B., Radhakrishna, S., Leiby, D., Herron, R., Mone, T., Hunter, R., & Kuehnert, M. (2009). Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 48(11), 1534–1540. <https://doi.org/10.1086/598931>

- Lee, M. G., & Van der Ploeg, L. H. (1997). Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. *Annual Review of Microbiology*, *51*, 463–489. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.463>
- Lenardo, M. J., Dorfman, D. M., & Donelson, J. E. (1985). The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potential role as a cap donor structure. *Molecular and Cellular Biology*, *5*(9), 2487–2490. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.9.2487-2490.1985>
- Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). (*Hemiptera, Significance*. 163.
- Li, C.-H., Irmer, H., Gudjonsdottir-Planck, D., Freese, S., Salm, H., Haile, S., Estévez, A. M., & Clayton, C. (2006). Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'→3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA (New York, N.Y.)*, *12*(12), 2171–2186. <https://doi.org/10.1261/rna.291506>
- Lima, L., Espinosa-Álvarez, O., Ortiz, P. A., Trejo-Varón, J. A., Carranza, J. C., Pinto, C. M., Serrano, M. G., Buck, G. A., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. G. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica*, *151*, 166–177.
- López, V., Pérez, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernandez, R., & Espinoza, B. (1998). *Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of Trypanosoma cruzi*. *69*, 239–254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00131-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00131-9)
- Luquetti, A. O. (1994). *Practical aspects of Chagas disease*. Elsevier Current Trends.
- Magalhães, L. M. D., Gollob, K. J., Zingales, B., & Dutra, W. O. (2022). *Review Pathogen diversity , immunity , and the fate of infections : lessons learned from Trypanosoma cruzi human – host interactions*. *5247*(21), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00265-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00265-2)
- Maguire, J. H., Hoff, R., Sherlock, I., Guimarães, A. C., Sleight, A. C., Ramos, N. B., Mott, K. E., & Weller, T. H. (1987). Cardiac morbidity and mortality due to Chagas' disease: Prospective electrocardiographic study of a Brazilian community. *Circulation*, *75*(6), 1140–1145. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.75.6.1140>

- Manley, J. L., & Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes & Development*, 10(13), 1569–1579. <https://doi.org/10.1101/gad.10.13.1569>
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Da Silva, F. M., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V. L. B., & Teixeira, M. M. G. (2009). A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*, 136(6), 641–655.
- Marin-Neto, J. A., De Almeida Filho, O. C., Pazin-Filho, A., & Maciel, B. C. (2002). Forma indeterminada da moléstia de Chagas. Proposta de novos critérios de caracterização e perspectivas de tratamento precoce da cardiomiopatia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 79(6), 623–627. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2002001500008>
- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., & Myler, P. J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 506–517.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 525241. <https://doi.org/10.1155/2010/525241>
- Martínez-Díaz, R. A., Escario, J. A., Nogal-Ruiz, J. J., & Gómez-Barrio, A. (2001). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(1), 53–59.
- Martínez, I., Nogueira, B., Martínez-Hernández, F., & Espinoza, B. (2013). Microsatellite and mini-exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 13(3), 181–187. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1072>
- Martins, A., Gomes, A., Eduardo, E., Lopes, J., Santana, L., Goreti, M., Galler, M., De Frias, R., Roger, R., & Siqueira-Batista, R. (2012). *Biology of Trypanosoma cruzi: An update*. 16(1), 45–58. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v16n1/v16n1a08.pdf>
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., & Myler, P. J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions

- within a single region. *Molecular Cell*, 11(5), 1291–1299.
- Milone, J., Wilusz, J., & Bellofatto, V. (2004). Characterization of deadenylation in trypanosome extracts and its inhibition by poly(A)-binding protein Pab1p. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(3), 448–457. <https://doi.org/10.1261/rna.5180304>
- Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood, J., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 10(1), 370. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-370>
- MINSA. (2001). *Ministerio de Salud Panamá: Resolución No. 374 del 7 de septiembre de 2001*.
- MINSA. (2012). *Guía Para El Abordaje Integral*.
- Mitelman, J. (2011). Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. *Revista Argentina de Cardiología*, 79(6), 544–564.
- Momen, H. (1999). *Momen\_Taxonomy\_Cruzi\_1999*. 94, 1–4.  
[sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop\\_files/info/biologia/parasitas/cruzi/filogenia\\_cruzi/momen\\_taxonomy\\_cruzi\\_1999.pdf%5Cpapers2://publication/uuid/C9216D94-0626-4269-8B30-46910EC98B7D](sftp://cerca@192.168.2.5/home/cerca/Desktop/data/laptop_files/info/biologia/parasitas/cruzi/filogenia_cruzi/momen_taxonomy_cruzi_1999.pdf%5Cpapers2://publication/uuid/C9216D94-0626-4269-8B30-46910EC98B7D)
- Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., ... Yusuf, S. (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*, 373(14), 1295–1306. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1507574>
- Mörking, P. A., Dallagiovanna, B. M., Foti, L., Garat, B., Picchi, G. F. A., Umaki, A. C. S., Probst, C. M., Krieger, M. A., Goldenberg, S., & Fragoso, S. P. (2004). TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.162>
- Mörking, P. A., Rampazzo, R. de C. P., Walrad, P., Probst, C. M., Soares, M. J., Gradia, D. F., Pavoni, D. P., Krieger, M. A., Matthews, K., Goldenberg, S., Fragoso, S. P., &

- Dallagiovanna, B. (2012). The zinc finger protein TcZFP2 binds target mRNAs enriched during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(6), 790–799. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000600014>
- Noé, G., De Gaudenzi, J. G., & Frasch, A. C. (2008). Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-107>
- Nunes, M. C. P., Reis, R. C. P., Colosimo, E. A., Ribeiro, A. L. P., Barbosa, F. B. L., Da Silva, J. L. P., Botoni, F. A., Barbosa, M. M., & Rocha, M. O. C. (2011). Risk estimation approach in Chagas disease is still needed. *International Journal of Cardiology*, 147(2), 294–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.12.044>
- Ogueta, S. B., Solari, A., & Téllez-Iñón, M. T. (1994). *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms possess a Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent protein kinase. *FEBS Letters*, 337(3), 293–297. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80212-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80212-2)
- Ohnishi, B. Y. T., Ohashi, Y., Nozu, K., Inoki, S., & March, R. (1983). *BY Takeo OHNISHI1~, Yasuhiro OHASHI,2~ Keiichi Nozu and Shozo INOKI\* Department of Biology and \*Department of Parasitology, Nara Medical University, Kashihara, Nara 634 (Received March 30, 1983). 30, 505–509.*
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., German Grehov, O. G., Kandrov, D., Rasputin, K., Syabro, M., & Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Onyekwelu, K. (2019). We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 % . *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Ouellette, M., & Papadopoulou, B. (2009). Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. *Journal of Biology*, 8(11), 100. <https://doi.org/10.1186/jbiol203>
- Ouyang, Q., Kaplan, P. D., Liu, S., & Libchaber, A. (1997). DNA solution of the maximal

- clique problem. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5337), 446–449.  
<https://doi.org/10.1126/science.278.5337.446>
- Panda, A. C., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2016). Affinity Pulldown of Biotinylated RNA for Detection of Protein-RNA Complexes. *Bio-Protocol*, 6(24).  
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2062>
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
- Parker, R., & Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(2), 121–127.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb724>
- Pastro, L., Smircich, P., Di Paolo, A., Becco, L., Duhagon, M. A., Sotelo-Silveira, J., & Garat, B. (2017). Nuclear Compartmentalization Contributes to Stage-Specific Gene Expression Control in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00008>
- Patterson, J. S., & Guhl, F. (2010). 5 - Geographical Distribution of Chagas Disease. In J. Telleria & M. Tibayrenc (Eds.), *American Trypanosomiasis* (pp. 83–114). Elsevier.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00005-8>
- Patterson, S., & Wyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, 30(6), 289–298.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>
- Paveto, C., Pereira, C., Espinosa, J., Montagna, A. E., Farber, M., Esteva, M., Flawia, M. M., & Torres, H. N. (1995). The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), 16576–16579.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16576>
- Pays, E., Vanhamme, L., & Berberof, M. (1994). Genetic controls for the expression of surface antigens in African trypanosomes. *Annual Review of Microbiology*, 48, 25–52.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.000325>
- Pazin-Filho, A., Romano, M. M. D., Almeida-Filho, O. C., Furuta, M. S., Viviani, L. F.,

- Schmidt, A., Marin-Neto, J. A., & Maciel, B. C. (2006). Minor segmental wall motion abnormalities detected in patients with Chagas' disease have adverse prognostic implications. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(4), 483–487. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000400008>
- Pérez-Díaz, L., Pastro, L., Smircich, P., Dallagiovanna, B., & Garat, B. (2013). Evidence for a negative feedback control mediated by the 3' untranslated region assuring the low expression level of the RNA binding protein TcRBP19 in *T. cruzi* epimastigotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(2), 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.096>
- Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. *Lancet infection disease. Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease*, 1(September), 92–100.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., & Mann, M. (2003). Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry*, 75(3), 663–670. <https://doi.org/10.1021/ac026117i>
- Rassi, A., Dias, J. C. P., Marin-Neto, J. A., & Rassi, A. (2009). Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*, 95(7), 524–534. <https://doi.org/10.1136/hrt.2008.159624>
- Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rassi, A., Rassi, A., & Sérgio, G. R. (2007). Predictors of mortality in chronic Chagas disease: A systematic review of observational studies. *Circulation*, 115(9), 1101–1108. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627265>
- Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., & Aslund, L. (2008). Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15884–15892.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M802081200>

- Riarte, A., Luna, C., Sabatiello, R., Sinagra, A., Schiavelli, R., De Rissio, A., Maiolo, E., García, M., Jacob, N., Pattin, M., Lauricella, M., Segura, E., & Vázquez, M. (1999). *Chagas' Disease in Patients with Kidney Transplants: 7 Years of Experience, 1989–1996*.
- Ribeiro, A. L., Nunes, M. P., Teixeira, M. M., & Rocha, M. O. C. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*, 9(10), 576–589. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.109>
- Ribeiro, A. L. P., Moraes, R. S., Ribeiro, J. P., Ferlin, E. L., Torres, R. M., Oliveira, E., & Rocha, M. O. C. (2001). Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. *American Heart Journal*, 141(2), 260–265. <https://doi.org/10.1067/mhj.2001.111406>
- Ribeiro, A. L., & Rocha, M. O. (1998). Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(3), 301–314. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821998000300008>
- Ribeiro, A. L., Sabino, E. C., Marcolino, M. S., Salemi, V. M. C., Ianni, B. M., Fernandes, F., Nastari, L., Antunes, A., Menezes, M., Oliveira, C. D. L., Sachdev, V., Carrick, D. M., Busch, M. P., & Murphy, E. L. (2013). Electrocardiographic Abnormalities in *Trypanosoma cruzi* Seropositive and Seronegative Former Blood Donors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002078>
- Ribeiro, I., Sevcsik, A. M., Alves, F., Diap, G., Don, R., Harhay, M. O., Chang, S., & Pecoul, B. (2009). New, improved treatments for Chagas disease: From the R&D pipeline to the patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000484>
- Riera, C., Verges, M., Iniesta, L., Fisa, R., Gállego, M., Tebar, S., & Portús, M. (2012). Short report: Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 412–416. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0111>

- Roca Saumell, C., Soriano-Arandes, A., Solsona Díaz, L., & Gascón Brustenga, J. (2015). Consensus document for the detection and management of Chagas disease in primary health care in a non-endemic areas. *Atencion Primaria*, 47(5), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2015.01.002>
- Rochitte, C. E., Oliveira, P. F., Andrade, J. M., Ianni, B. M., Parga, J. R., Ávila, L. F., Kalil-Filho, R., Mady, C., Meneghetti, J. C., Lima, J. A. C., & Ramires, J. A. F. (2005). Myocardial delayed enhancement by magnetic resonance imaging in patients with Chagas' disease: A marker of disease severity. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(8), 1553–1558. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.06.067>
- Rodrigues, J. C. F., Godinho, J. L. P., & de Souza, W. (2014). Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Sub-Cellular Biochemistry*, 74, 1–42. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_1)
- Romagnoli, B. A. A., Holetz, F. B., Alves, L. R., & Goldenberg, S. (2020). RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00056>
- Romaniuk, M. A. (2016). Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites. *World Health Organization*, 7(1), 146. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.146>
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. (Médica Pan). <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Wv026CUhR6YC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Microbiologia+y+Parasitologia+3ra.+Ed.+Raul+Romero+Cabello&ots=n7rxlAxJKe&sig=efIjhX2G8Of8KZmlccg1kGlulSw#v=onepage&q=Microbiologia+y+Parasitologia+3ra.+Ed.+Raul+Romero+Cabello&f=false>
- Rudenko, G., Bishop, D., Gottesdiener, K., & Van der Ploeg, L. H. (1989). Alpha-amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal*, 8(13), 4259–4263.
- Ruiz, E., Ramírez, C. A., Nocua, P., Requena, J. M., & Puerta, C. J. (2018). Identificación de proteínas reguladoras de la expresión génica en tripanosomátidos. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 42(165), 306.

<https://doi.org/10.18257/raccefyn.671>

Sabalette, K. B., Romaniuk, M. A., Noé, G., Cassola, A., Campo, V. A., & De Gaudenzi, J. G. (2019). The RNA-binding protein TcUBP1 up-regulates an RNA regulon for a cell surface-associated *Trypanosoma cruzi* glycoprotein and promotes parasite infectivity. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(26), 10349–10364.

<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007123>

Sabino, E. C., Ribeiro, A. L., Salemi, V. M. C., Di Lorenzo Oliveira, C., Antunes, A. P., Menezes, M. M., Ianni, B. M., Nastari, L., Fernandes, F., Patavino, G. M., Sachdev, V., Capuani, L., De Almeida-Neto, C., Carrick, D. M., Wright, D., Kavounis, K., Gonzalez, T. T., Carneiro-Proietti, A. B., Custer, B., ... Murphy, E. L. (2013). Ten-Year incidence of chagas cardiomyopathy among asymptomatic *trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*, *127*(10), 1105–1115.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123612>

Saldaña, A., Santamaría, A. M., Pineda, V., Vásquez, V., Gottdenker, N. L., & Calzada, J. E. (2018). A darker chromatic variation of *Rhodnius pallescens* infected by specific genetic groups of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* from Panama. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 1–6.

Samudio, F., & Brandão, A. (2018). *Minimum free energy predicted base pairing in the 39 nt spliced leader and 5' UTR of calmodulin mRNA from Trypanosoma cruzi: influence of the multiple trans-splicing sites*. *90*, 2311–2316.

Samudio, F., Ortega-Barría, E., Saldaña, A., & Calzada, J. (2007). Predominance of *Trypanosoma cruzi* I among Panamanian sylvatic isolates. *Acta Tropica*, *101*(2), 178–181.

Sanchez-Sancho, F., Campillo, N., & Paez, J. (2010). Chagas Disease: Progress and New Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, *17*(5), 423–452.

<https://doi.org/10.2174/092986710790226101>

Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F. P., Dastidar, E. G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C. M., & van Hoof, A. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nature*

*Structural & Molecular Biology*, 16(1), 56–62. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1528>

Schenone, H., Gaggero, M., Sapunar, J., Contreras, M. D. C., & Rojas, A. (2001). Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile. Report of two cases. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 43(4), 231–232.

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652001000400011>

Scherer, M., Levin, M., Butter, F., & Scheibe, M. (2020). Quantitative Proteomics to Identify Nuclear RNA-Binding Proteins of Malat1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031166>

Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hijar, G., Zulantay, I., Lucero, R. H., Velazquez, E., Tellez, T., Leon, Z. S., Galvão, L., Nolder, D., ... Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>

Schimanski, B., Nguyen, T. N., & Günzl, A. (2005). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 7303–7313.

<https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7303-7313.2005>

Schoenberg, D. R., & Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics*, 13(4), 246–259. <https://doi.org/10.1038/nrg3160>

Schürch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R., & Roditi, I. (1994). Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Molecular and Cellular Biology*, 14(6), 3668–3675.

<https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3668-3675.1994>

Schwabl, P., Imamura, H., Van den Broeck, F., Costales, J. A., Manguashca-Sánchez, J., Miles, M. A., Andersson, B., Grijalva, M. J., & Llewellyn, M. S. (2019). Meiotic sex in Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Nature Communications*, 10(1), 3972.

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-11771-z>

- Schwede, A., Ellis, L., Luther, J., Carrington, M., Stoecklin, G., & Clayton, C. (2008). A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells. *Nucleic Acids Research*, *36*(10), 3374–3388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn108>
- Shapiro, T. A. (1995). The Structure and Replication of Kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, *49*(1), 117–143. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.49.1.117>
- Shaw, J. M., Feagin, J. E., Stuart, K., & Simpson, L. (1988). Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved amino acid sequences and AUG initiation codons. *Cell*, *53*(3), 401–411. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90160-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90160-2)
- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, *54*(6), 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Siegel, T. N., Hekstra, D. R., Wang, X., Dewell, S., & Cross, G. A. M. (2010). Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Research*, *38*(15), 4946–4957.
- Smircich, P., Eastman, G., Bispo, S., Duhagon, M. A., Guerra-Slompo, E. P., Garat, B., Goldenberg, S., Munroe, D. J., Dallagiovanna, B., Holetz, F., & Sotelo-Silveira, J. R. (2015). Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, *16*(1), 443. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1563-8>
- Smircich, P., Forteza, D., El-Sayed, N. M., & Garat, B. (2013). Genomic Analysis of Sequence-Dependent DNA Curvature in *Leishmania*. *PLOS ONE*, *8*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063068>
- Smith, H. O., Hutchison, C. A. 3rd, Pfannkoch, C., & Venter, J. C. (2003). Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15440–15445. <https://doi.org/10.1073/pnas.2237126100>
- Sosa-Estani, S., Viotti, R., & Segura, E. L. (2009). Therapy, diagnosis and prognosis of

- chronic Chagas disease: Insight gained in Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 167–180. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900023>
- Sousa, O. E., Samudio, F., Juncá, C. de, & Calzada, J. E. (2006). Molecular characterization of human *Trypanosoma cruzi* isolates from endemic areas in Panama. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 455–457.
- Souza, C. F., Carneiro, A. B., Silveira, A. B., Laranja, G. A. T., Silva-Neto, M. A. C., Costa, S. C. G. da, & Paes, M. C. (2009). Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.135>
- Souza, W. De. (2009). *Structural organization of Trypanosoma cruzi*. 104(May), 89–100.
- Souza, F. F., Castro-e-Silva, O., Marin Neto, J. A., Sankarankutty, A. K., Teixeira, A. C., Martinelli, A. L. C., Gaspar, G. G., Melo, L., Figueiredo, J. F. C., Romano, M. M. D., Maciel, B. C., Passos, Ä. D. C., & Rossi, M. A. (2008). Acute Chagasic Myocardopathy After Orthotopic Liver Transplantation With Donor and Recipient Serologically Negative for *Trypanosoma cruzi*: A Case Report. *Transplantation Proceedings*, 40(3), 875–878. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.02.032>
- Srisawat, C., & Engelke, D. R. (2001). Streptavidin aptamers: affinity tags for the study of RNAs and ribonucleoproteins. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(4), 632–641. <https://doi.org/10.1017/s135583820100245x>
- Stanne, T. M., & Rudenko, G. (2010). Active VSG expression sites in *Trypanosoma brucei* are depleted of nucleosomes. *Eukaryotic Cell*, 9(1), 136–147. <https://doi.org/10.1128/EC.00281-09>
- Stemmer, W. P., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M., & Heyneker, H. L. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene*, 164(1), 49–53. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00511-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00511-4)
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S., & Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases.

*Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1301–1310. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>

Talavera-López, C., Messenger, L. A., Lewis, M. D., Yeo, M., Reis-Cunha, J. L., Matos, G. M., Bartholomeu, D. C., Calzada, J. E., Saldaña, A., Ramírez, J. D., Guhl, F., Ocaña-Mayorga, S., Costales, J. A., Gorchakov, R., Jones, K., Nolan, M. S., Teixeira, S. M. R., Carrasco, H. J., Bottazzi, M. E., ... Andersson, B. (2021). Repeat-Driven Generation of Antigenic Diversity in a Major Human Pathogen, *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.614665>

Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>

Teixeira, S. M. R. (1998). Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(12), 1503–1516. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998001200001>

Télliez-Iñón, M. T., Ulloa, R. M., Torruella, M., & Torres, H. N. (1985). Calmodulin and Ca<sup>2+</sup>-dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 17(2), 143–153. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90013-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90013-1)

Thomas, S., Green, A., Sturm, N. R., Campbell, D. A., & Myler, P. J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics*, 10(1), 152. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-152>

Tomlinson, S., Vandekerckhove, F., Frevert, U., & Nussenzweig, V. (1995). The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*, 110 ( Pt 5, 547–554. <https://doi.org/10.1017/s0031182000065264>

Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M. C., Dramaix, M., Truyens, C., & Carlier, Y. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2), 201–209. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.201>

- Toso, A., Vial, F., & Galanti, N. (2011). Oral transmission of chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Tzizik, D. M., & Borchardt, R. A. (2018). Chagas disease: An underrecognized diagnosis. *JAAPA : Official Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 31(12), 30–33. <https://doi.org/10.1097/01.jaa.0000547749.92933.6a>
- Ullu, E., Matthews, K. R., & Tschudi, C. (1993). Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Molecular and Cellular Biology*, 13(1), 720–725. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.1.720-725.1993>
- Ullu, E., & Tschudi, C. (1991). Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(22), 10074–10078. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10074>
- Urbina, J. A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 311–318. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900041>
- Wahle, E., & Keller, W. (1992). The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 419–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.002223>
- Walker, S. C., Scott, F. H., Srisawat, C., & Engelke, D. R. (2008). RNA affinity tags for the rapid purification and investigation of RNAs and RNA-protein complexes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 488, 23–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-475-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-475-3_3)
- Wang, W., Peng, D., Baptista, R. P., Li, Y., Kissinger, J. C., & Tarleton, R. L. (2021). Strain-specific genome evolution in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLOS Pathogens*, 17(1), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009254>
- Weatherly, D. B., Boehlke, C., & Tarleton, R. L. (2009). Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*, 10(1), 255.

<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-255>

Wharton, R. P., & Aggarwal, A. K. (2006). mRNA regulation by Puf domain proteins. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2006(354), pe37. <https://doi.org/10.1126/stke.3542006pe37>

WHO. (2012). *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis : technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. World Health Organization.

WHO. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Chagas Disease in Latin America: An Epidemiological Update Based on 2010 Estimates*, 90(6), 33–43.

WHO. (2020). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. 11 de Marzo Del 2020. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

Windbichler, N., & Schroeder, R. (2006). Isolation of specific RNA-binding proteins using the streptomycin-binding RNA aptamer. *Nature Protocols*, 1(2), 637–640. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.95>

Xiong, A.-S., Yao, Q.-H., Peng, R.-H., Li, X., Fan, H.-Q., Cheng, Z.-M., & Li, Y. (2004). A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences. *Nucleic Acids Research*, 32(12), e98–e98. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh094>

Zhang, X., Zhu, Q., Tian, T., Zhao, C., Zang, J., Xue, T., & Sun, B. (2015). Identification of RNAIII-binding proteins in *Staphylococcus aureus* using tethered RNAs and streptavidin aptamers based pull-down assay. *BMC Microbiology*, 15(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0435-3>

Zhivotovsky, B., & Orrenius, S. (2011). Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium*, 50(3), 211–221. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.003>

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O.,

Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Strum, N. R., Tibayrenc, M., & Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Corrosion and Protection*, 30(6), 432–436.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

Zulantay, I., Apt, W., Gil, L. C., Rocha, C., Mundaca, K., Solari, A., Sánchez, G., Rodriguez, C., Martínez, G., De Pablos, L. M., Sandoval, L., Rodríguez, J., Vilchez, S., & Osuna, A. (2007). The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101(8), 673–679. <https://doi.org/10.1179/136485907X241415>

Zulantay, I., Apt, W., Valencia, C., Torres, A., Saavedra, M., Rodríguez, J., Sandoval, L., Martínez, G., Thieme, P., & Sepúlveda, E. (2011). Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2224–2226. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr313>