

Algunos aspectos de la organización y regulación genética en *Trypanosoma cruzi*: El agente etiológico de la enfermedad de Chagas

Alberto Gómez Gutiérrez*, Víctor M. Monteón Padilla**

RESUMEN. La infección por *Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas que es endémica en algunas zonas de México. Su agente etiológico que es un parásito obligado presenta un comportamiento clonal y por lo tanto hay diversas cepas del parásito con características genéticas diferenciales. En el presente trabajo se revisan algunos aspectos relevantes de la organización genómica, los mecanismos de transcripción y postranscripción de *T. cruzi*, que es un organismo eucariote con un genoma rico en secuencias de repetición, genes arreglados en paquetes con espacios intergénicos y pocas secuencias promotoras identificadas. Así como un RNA primario policistrónico y generalmente sin intrones que se madura a través de *trans-splicing* y cuya regulación ocurre primordialmente a nivel postranscripcional.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, regulación genética, enfermedad de Chagas.

ABSTRACT. *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas disease have been recognized as endemic problem in some areas of México, its etiologic agent, the *T. cruzi* parasite shows a clonal behavior with particular genetic characteristics within populations. In the present work we review some significant aspects of *T. cruzi* such as its genomic organization, transcription and post-transcriptional mechanisms. *T. cruzi* is an eukaryotic micro-organism with highly repeated sequences in its genome, their genes are tandem accommodated and interrupted by short intergenic spaces, and only few promoter sequences have been identified at the moment. A primary polycistronic RNA without introns that maturate by a *trans-splicing* mechanism with differential gene expression regulated basically at the post-transcriptional level.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, genetic regulation, Chagas disease.

ASPECTOS GENERALES DE LA INFECCIÓN EN MÉXICO

Los primeros casos de enfermedad de Chagas en México fueron reconocidos en el estado de Oaxaca en 1940 (Mazotti 1940). A partir de esa fecha se han venido realizando diversos estudios epidemiológicos, que identifican las Costas y la parte Sur-Sureste como zonas endémicas de nuestro país (Tay et al 1981; Velasco-Castrejón et al 1986; Salazar-Schetino et al 1988; Velasco-Castrejón et al 1992; Monteón et al 1996). En un estudio llevado a cabo en el estado de Chiapas, se encontraron seroprevalencias diferenciales en humanos de tres regiones estudiadas: en la zona de la selva y la montaña se observó una seroprevalencia alta de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* de hasta 32%, mientras en la costa del mismo estado se reconoció sólo el 1% (Mazariego-Arana et al 2001). En el altiplano

mexicano como Puebla y Morelos se ha informado también seroprevalencias variables, que oscilan desde 4 hasta el 17% (Rangel-Flores et al 2001; Sosa-Jurado et al 2003). Estos datos sugieren que la distribución de la infección es heterogénea dentro del país.

Así mismo, se ha reconocido que el vector transmisor de la infección está prácticamente en toda la república y existen alrededor de 31 especies, muchas de ellas infectadas (Vidal-Acosta et al 2000).

Desde que se informó en un estudio pionero en el estado de Oaxaca, el papel de la transfusión sanguínea como otro mecanismo de transmisión de la infección (Goldsmith et al 1978), se han venido realizando diversos estudios y en años recientes se ha profundizado sobre la importancia de este mecanismo, encontrando donadores positivos en diversos estados del país. Por ejemplo en los estados de Puebla, Morelos, Jalisco y en la ciudad de México se ha visto que la seroprevalencia oscila entre el 17 al 0.3% (Ramos-Echevarría et al 1993; Trujillo-Contreras et al 1993; Guzmán-Bracho et al 1998; Guzmán-Bracho et al 1998; Monteón-Padilla et al 1999; Sánchez-Guillén et al 2002). En un estudio más amplio que incluyó a 18 bancos de sangre de 18 estados del país, se encontró una seroprevalencia promedio del 1.5% (Guzmán-Bracho et al 1998).

Todos estos datos apoyan fuertemente que la infección por *T. cruzi* en nuestro país puede ser endémica para algu-

* Estudiante de Doctorado, Instituto Nacional de Cardiología "I. Chávez".

** Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Autónoma de Campeche.

nas zonas y con riesgo a nivel nacional, esto último debido a la migración que se viene dando de poblaciones de zonas rurales endémicas hacia las ciudades, de tal forma que la infección tiende a urbanizarse, ya que puede adquirirse por transfusión sanguínea de estos donadores infectados y que son portadores asintomáticos de la infección. Debido a que en la mayoría de los bancos de sangre de nuestro país no se realiza de forma obligatoria el escrutinio serológico para detectar la infección por *T. cruzi*, entonces el riesgo es cada vez mayor, a no ser que se implementen procedimientos para su detección.

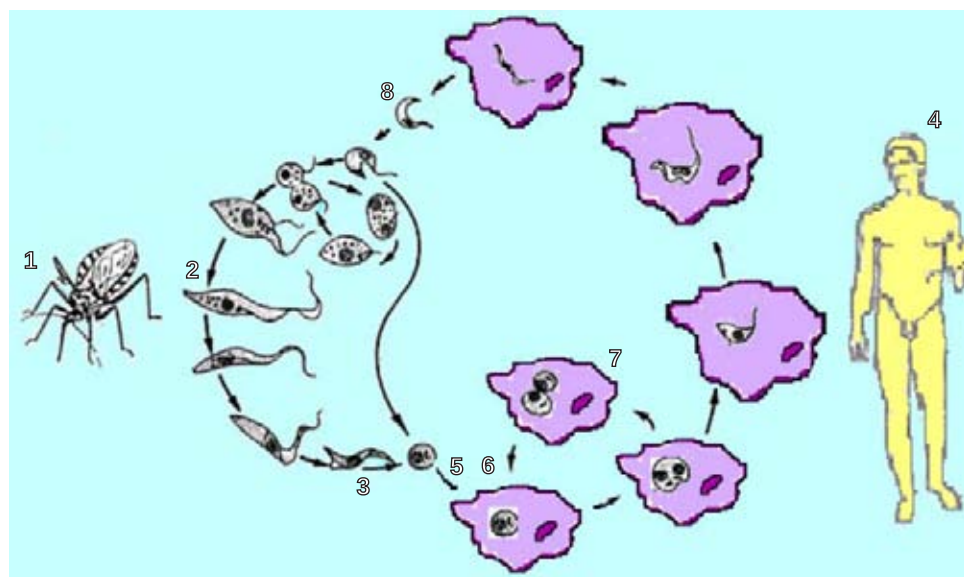
TRYPANOSOMA CRUZI

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (TA) es un protozooario digenético, que en su ciclo de vida están involucrados dos hospederos: un invertebrado (un insecto triatomino) donde se desarrollan dos fases de vida del parásito, el epimastigote y tripomastigote metacíclico y un hospedero vertebrado (mamífero) donde se desarrollan las otras dos fases del parásito, el tripomastigote sanguíneo y el amastigote.

Cuando un triatomino infectado por *T. cruzi* se está alimentando de sangre, su abdomen se llena y se estimula el reflejo de deyección; así, en las heces u orina se puede encontrar tanto epimastigotes como tripomastigotes metacíclicos (Figuras 1a y b), este último es la fase infecciosa para el mamífero. Si las heces u orina son depositadas cerca de una lesión en la piel, el tripomastigote metacíclico gana acceso al organismo a través de esta lesión y allí *in situ* parasitará a las células de la dermis o terminará siendo

fagocitado por PMN o monocitos que se hayan infiltrado en el tejido (Figuras 1c y d). Una vez en el interior de la célula, se transformará en amastigote, que es la fase intracelular replicativa (Figura 1e), después de varios ciclos de división binaria, los amastigotes se transformarán en tripomastigotes, los cuales lisarán a la célula que los contiene y serán liberados al torrente sanguíneo (Figura 1 f). De esta manera se diseminan hacia otros tejidos y cuando un triatomino se alimenta de este mamífero infectado, los tripomastigotes sanguíneos infectarán al triatoma y en su intestino se transformarán en epimastigotes, que es la fase replicativa en el insecto, para posteriormente transformarse de nuevo a tripomastigotes metacíclicos, que saldrán en las heces y orina del triatoma cuando se alimente de nuevo (Figura 1 g).

El parásito forma poblaciones muy heterogéneas de individuos con un comportamiento clonal (Deininger & Daniels 1986; Tibayrenc et al 1990), que dan origen a diversas cepas en distintas zonas geográficas. Cada cepa está conformada por un grupo finito de clonas y éstas se van seleccionando dependiendo de la especie de hospedero mamífero, proliferando aquellas clonas que mejor se adaptan, y de la especie de insecto vector involucrado en la transmisión, teniendo mayor posibilidad aquellas clonas con mayor capacidad de metaciclogénesis, ya que ésta varía en función de la especie de triatoma y del ciclo de transmisión que se esté llevando a cabo, ya sea el silvestre, peridoméstico o doméstico. Es por ello que se detecta polimorfismo genético entre las diferentes cepas, cuando se analizan por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: Polimorfismo de la longitud del fragmento de res-



El triatoma vector (1) se infecta con la fase de tripomastigote sanguíneo (8) de un mamífero infectado, el tripomastigote se diferencia a epimastigote (2) en el intestino del vector y posteriormente se transforma a tripomastigote metacíclico (3), que es la fase infectante al humano (4), en el sitio de inoculación como la piel (5) invade a las células (6) y se divide de forma intracelular como amastigote (7), después de varias rondas de replicación se transforma en tripomastigote y se libera al torrente sanguíneo para invadir nuevas células, pero también resulta la fase infectante para un vector (1) que en ese momento se alimenta de sangre de ese humano infectado, cerrándose el ciclo.

Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

tricción) y RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA: DNA Polimórfico amplificado aleatoriamente) (Morel et al 1980; Tibayrenc et al 1993). El reconocimiento de estas diferencias ha llevado a clasificar al *T. cruzi* dentro de distintos grupos y eventualmente establecer asociaciones con las entidades clínicas de la enfermedad, con sus ciclos de transmisión (selvático, peridoméstico y doméstico) y su filogenia (Souto et al 1996; Oliveira et al 1998; Fernandes et al 1999). Por estudios de marcadores nucleares se ha propuesto que existen dos genotipos o linajes de *T. cruzi*, llamados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (Souto et al 1996; Tibayrenc 1995) y dentro de este último hay subgrupos IIa, IIb, IIc, IId y IIe (anonymous, 1999). El linaje I se ha asociado a los ciclos de transmisión selvática y que al parecer son los genotipos que se encuentran en México; mientras que el linaje II se ha asociado más fuertemente a los ciclos de transmisión doméstica donde el humano se ve seriamente involucrado.

En relación a la filogenia, se sabe que si un organismo presenta un comportamiento clonal, su información genética deberá haberse mantenido sin intercambio entre los diferentes linajes del organismo y como se señaló anteriormente, en *T. cruzi* se ha propuesto que este tipo de comportamiento existe. Cabe aclarar que es difícil determinar si un organismo ha evolucionado de forma clonal, por divergencias o intercambios genéticos, debido a que muchas veces no se conoce con exactitud cuál era el comportamiento del mismo organismo millones de años atrás y sólo se tienen evidencias de su evolución a través de algunos genes y la construcción de árboles filogenéticos. Dentro de la construcción de árboles filogenéticos existen dos métodos para ello: el *fenetista* (phenetics), que considera el mayor número de características a las cuales se les asigna un marcador numérico y estos valores son analizados matemáticamente y el *cladista* (cladistics) que si bien toma también el mayor número de características, no todas tienen el mismo valor, dando mayor importancia a aquellas características que tengan relevancia en el proceso evolutivo de los organismos en cuestión. De esta forma se dice que hay evolución convergente (homoplasia) cuando la misma característica evoluciona o aparece en dos linajes diferentes, mientras que un carácter ancestral es cuando se ha dado origen a características derivadas de éste en diferentes organismos (homología).

En *T. cruzi* se ha sugerido que debió existir intercambio genético entre linajes, idea que es apoyada por el análisis de dos enzimas nucleares (tripanotio reductasa y dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa) y dos enzimas mitocondriales (subunidad II de la citocromo C oxidasa y de la NADH deshidrogenasa) (Machado & Ayala 2001). Estas observaciones llevan a preguntar si los tripanosomas tuvieron un origen monofilético o si provienen de más de

dos ancestros (parafiléticos o polifiléticos). Los estudios pioneros que utilizaron genes mitocondriales y ribosomales sugieren esta última posibilidad (Gómez et al 1991; Fernandes et al 1993; mas sin embargo en estudios posteriores utilizando genes de la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa y el RNA de la subunidad pequeña del ribosoma, sugiere que todos los tripanosomas sanguíneos de vertebrados, son monofiléticos (un solo origen) y que su ancestro debió de ser un parásito de insectos que se adaptó a los vertebrados (Hamilton et al 2004). (El término monofilético se refiere cuando dos secuencias derivan de una misma secuencia ancestral). Al grupo de secuencias monofiléticas se les llama "clado". Por lo tanto, dependiendo del tipo de marcador genético que se utilice, esto nos conducirá a conclusiones diferentes, por lo que se debe escoger el mayor número de marcadores posibles para localizar aquellos que fueron ancestrales.

En México el genotipo o linaje I de *T. cruzi* es el que con mayor frecuencia se ha reconocido, a diferencia de lo encontrado en Sudamérica; aunque algunos investigadores sugieren que el linaje I es menos patológico al humano, sin embargo la forma cardíaca de la enfermedad de Chagas en México es clínicamente similar a la reportada en Sudamérica, lo que sugeriría que ambos linajes son patogénicos.

El reconocer que existen diferentes clonas circulando entre los diversos hospederos y el transmisor y que estas poblaciones de parásitos se van seleccionando al pasar de vector-hospedero-vector; entonces el conocimiento de su organización genómica, los mecanismos de regulación de la transcripción y postranscripción son elementos determinantes que podrían ayudar a explicar su evolución, adaptación a sus diferentes hospederos, las formas clínicas que producen, la diversidad de virulencia, las interacciones hospedero-parásito y sus posibles blancos terapéuticos.

ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

La caracterización citogenética del parásito ha sido difícil de establecer, ya que sus cromosomas se condensan pobremente durante la división nuclear (Henriksson et al 1996). Sin embargo, un estudio a nivel de microscopía electrónica permitió detectar 10 placas densas durante la división nuclear y la asociación de estas placas con el eje ecuatorial sugirió que podría contener al menos 10 cromosomas (Solari 1980).

Se sabe que los centrómeros son los locis donde el cinetocoro se ensambla, este complejo núcleo proteico es el lugar donde los microtúbulos se anclan para la segregación de los cromosomas. Los centrómeros de metazoarios tienden a ser muy largos, de 250 kb hasta 5,000 kb, en le-

vaduras de 40 a 120 kb y en *T. cruzi* se ha observado que son de aproximadamente 16 kb, siendo ricos en secuencias GC (Obado et al 2005).

El desarrollo de la electroforesis de campo pulsado permitió avances para la separación preliminar de los cromosomas del parásito y así proponer que *T. cruzi* es un organismo diploide con un genoma que se distribuye en pares de cromosomas homólogos y que en general varían en tamaño debido a las unidades de repetición o secuencias no codificadoras (Tibayrenc & Ayala 1987). Su genoma haploide se estimó de 30-40 Mb (mega bases) con alrededor de 10,000 genes, sus cromosomas con un tamaño entre 0.3-10 Mb. Además con base en estudios de localización de genes presentes en copia única como los genes de mantenimiento (housekeeping), se estableció que el parásito no presenta meiosis (Tibayrenc & Ayala 1987).

Al aplicar el sistema CHEF (Contour-clamped homogeneous electric field, Campo eléctrico homogéneo ajustado al contorno), que es capaz de resolver y separar cromosomas hasta de 1.6 Mpb, se encontró que podían identificarse entre 20 y 24 bandas cromosómicas, dependiendo de la cepa de parásito empleada (Wagner & So 1990).

Utilizando este mismo procedimiento para separar cromosomas y utilizando sondas de genes multicopia, como los de las α -tubulina, β -tubulina, ubiquitina, rRNA y la proteína de superficie de 85kDa de *T. cruzi*, se encontró que el tamaño y número de cromosomas donde están contenidos estos genes (locis) varían ampliamente entre las cepas, lo que sugiere que existe un fenómeno de translocación de los mismos. Este fenómeno de transposición fue observado al utilizar como sonda el gen del RNA, llamado mini-exón que tiene un tamaño aproximado de 610 pb, que es codificado en copia múltiple y arreglado uno tras otro. Se observó que el patrón de hibridación cambiaba en función del tiempo de cultivo de los parásitos, estas observaciones sugirieron que el paquete de genes del mini-exón pudiera ser la principal causa de rearrreglo y transposición (Lanar et al 1981), aunado al alto contenido de retrotransposones, se explicaría porqué se presentan tantos genes repetidos y además uno tras otro. Estos genes pueden ser el mismo gen que se repite varias veces o hasta cientos de veces, aunque no con secuencias idénticas o puede haber más de un gen arreglado uno tras otro (Arner et al 2007).

A partir de la información recientemente obtenida del proyecto de secuenciación del genoma de *T. cruzi*, donde se empleó la cepa de referencia CL-Brener, se estableció que su genoma haploide es de 67 Mb y sus haplotipos presentan un alto grado de ocurrencia o presencia de dos o más genes diferentes siempre en un mismo cromosoma particular, concepto que en inglés se conoce como "synteny" y el número de genes se estimó ahora alrededor de 12,000. Otro hallazgo importante fue reconocer que su genoma

presenta un alto grado de secuencias repetidas, que constituyen hasta el 50% del mismo y la mayoría de estas secuencias repetidas son familias de genes que codifican para proteínas de superficie del parásito, como las mucinas y las transialidasas, además de repeticiones subteloméricas y retrotransposones.

Los genes se encuentran en grupos o familias, arreglados uno tras otro en la misma hebra de DNA con secuencias intergénicas y sin intrones. Por ejemplo, las proteínas de superficie del parásito son codificadas por familias de genes extremadamente grandes y muy heterogéneas (El-Sayed et al, 2005). Aunque el número de copias de estos genes quedó subestimado en el proyecto de secuenciación del genoma de *T. cruzi*, debido a que están acomodados uno tras otro y pueden repetirse hasta cientos de veces, que al tratar de unir los fragmentos secuenciados obtenidos por la técnica de "Shotgun" resulta difícil saber con precisión cuántas veces se ha repetido un determinado gen. Se ha observado que existe un alto grado de conservación de estas copias repetidas dentro del mismo cromosoma, no así cuando se encuentra localizada en diferentes cromosomas, lo que sugeriría que la expansión de estos genes es reciente. Por lo que ha resultado particularmente importante agrupar estas isoformas en familias de genes, que contienen cientos de miembros y diversos entre sí.

Así tenemos que la miosina tiene 7 familias de genes por haplotipo, dispersos en diferentes locis, pero con una diversidad considerable en sus secuencias, generando de esta manera dos tipos de miosina. Otro ejemplo lo constituyen las transialidasas, de las cuales existen más de 1,000 miembros, pero sólo una fracción pequeña de ellos codifica para la enzima funcional.

Al analizar la base de datos de los genes repetidos de *T. cruzi* con distintos métodos, como alineamientos múltiples, secuencias codificadoras de genes y pseudogenes, secuencias codificadoras colapsadas y localización de "cassettes" de repetición, se encontró que estas unidades de repetición contenían al gen, secuencias no codificadoras o espacios intergénicos, y algunas ocasiones hasta dos genes diferentes se podían repetir; el arreglo en "tándem" de uno tras otro, de gen-secuencia no codificadora-gen secuencia no codificadora, podría repetirse hasta cientos de veces, que se encontraba flanqueado por una secuencia única en cada extremo (Arner et al 2007).

También se observó que esta unidad de repetición podía cambiar dentro del mismo haplotipo, pero rara vez conducía a un cambio de aminoácidos y por lo tanto a la función de la proteína. Aunque se han observado casos de polimorfismo como el gen de la miosina y el de las transialidasas, en estas últimas, unas tienen función enzimática y otras la pierden.

Por estudios de citometría de flujo, se observó que el genoma del parásito sufre frecuentes duplicaciones o disminuciones en su tamaño (Lanar et al 1981; Dvorak 1984), fenómeno que podría asociarse a expansión/contracción de elementos de repetición de DNA, que como ya sabemos son muy abundantes en *T. cruzi*, y/o eliminación o amplificaciones de secuencias repetidas de genes que se encuentran en uno tras otro “tándem”, lo que provocaría un cambio en el tamaño.

En el 2001 se analizó el polimorfismo cromosómico y el tamaño del genoma de los dos linajes de *T. cruzi*, encontrándose que el número de bandas cromosómicas fue mayor para *T. cruzi* II (19-22 bandas) que para *T. cruzi* I (17-18 bandas) (Wen et al 2001). Todo esto indica claramente la variación y polimorfismo dentro del parásito. Pero más recientemente se estableció que el tamaño del genoma es de 60,372,297 bases, y el número de cromosomas para el linaje II es de 30 y entre 17-22 para el linaje I (Vargas et al 2004; El-Sayed et al 2005).

La función de estas familias de DNA de repetición no se ha determinado cabalmente, sin embargo se sugiere que puedan estar implicadas en los procesos de regulación postranscripcional, como en el caso de las secuencias *Alu* en humanos (Deininger & Daniels 1986), además de promover el desarrollo evolutivo por su capacidad de transponerse dentro del genoma (Epplen 1992).

Estas secuencias de repetición se han clasificado como secuencias no largas de repetición terminales (non-LTR) que incluye a los llamados LINEs (Long Interspersed Nucleotide Elements: Elementos nucleotídicos largos interdispersos) y a los SINEs (Short Interspersed Nucleotide Elements: Elementos nucleotídicos cortos interdispersos); los LINEs son considerados elementos autónomos, ya que ellos mismos codifican para las enzimas (reverso-transcriptasa, endonucleasa, RNasa H) y secuencias consenso en el DNA para su reconocimiento, que promover su movilización dentro del genoma, también llamados elementos poli (A), los cuales están flanqueados por secuencias de tamaño variable que son el blanco de la duplicación y carecen de las secuencias de repetición largas terminales, que se encuentran en los retrovirus, su tamaño oscila en varios kilobases. Los LINE son elementos que codifican para enzimas involucradas en su propia movilización, mientras que los SINE son reconocidos y movilizadas por la maquinaria de los LINE.

La movilización de los “non-LTR” se da al parecer porque contienen un promotor interno, que es capaz de ser leído por la RNA pol II, promoviendo así su transcripción, y generando un RNAm que codifica para una endonucleasa, una 3'fosfatasa, 3'fosfodiesterasa, una reverso transcriptasa, una RNasa H y una chaperona para ácidos nucleicos. (Martin et al 1995; Heras et al 2007).

Mientras que los LTR son retroelementos que incluyen a los retrovirus y retrotransposones, que conservan sus propios promotores para la RNA pol, que son transcritos de forma reversa a partir de RNA, generando un cDNA y luego un DNA de doble cadena que puede insertarse y transponerse.

Los SINESs tienen un tamaño menor a los 500 pb y carecen de la capacidad de transponerse por sí solos, por lo que requieren de enzimas codificadas en trans, como se mencionó anteriormente.

En *T. cruzi* el primer elemento de repetición encontrado fue el DNA “satélite” que representa hasta el 9% de su genoma nuclear y que fue aislado después de someter a digestión el DNA total del parásito con la enzima *Bsp* I y separarlo a través de un gradiente de sacarosa. Su tamaño resultó de 195-196 pb encontrándose del orden de 120,000 copias por genoma (Sloof et al 1983). Posteriormente se detectaron secuencias de repetición llamadas E13, que se encontraron dispersas a través de todo el genoma como un grupo polimórfico de secuencias con un número de copias alrededor de 1×10^4 , y que representa aproximadamente el 7% de su genoma. Este elemento es especie específico, ya que no presenta hibridación cruzada con genomas de otros tripanosomátidos. Otra secuencia de repetición en menor número es la E12 y que se encuentra distribuida en todos los cromosomas (Requena et al 1992; Requena et al 1994).

Para la identificación de estas secuencias de repetición, el procedimiento básico que se siguió fue la digestión de un banco genómico del parásito con la enzima *Eco* RI, para después probarse con una sonda total de *T. cruzi*. Las clonas que presentaron una señal de hibridación intensa se aislaron y fueron usadas como sondas en el DNA del parásito digerido, pero ahora con diferentes enzimas de restricción, separado por electroforesis y transferido a membranas (Southern blot). Los resultados obtenidos, por ejemplo con la sonda E12, mostraron que independientemente de la enzima de restricción utilizada, se observaba un patrón de hibridación complejo, indicando que existía una alta dispersión de este elemento dentro del genoma (Requena et al 1992).

Al realizar la separación del DNA de *T. cruzi* en una electroforesis alternante en gel de campo ortogonal (OFAGE) para la separación de los cromosomas, el cual se transfería a membranas para probar con la sonda en cuestión, se observó que la sonda hibridaba con la mayoría de los cromosomas, lo que indicaba que se encontraba esta secuencia distribuida en todos ellos. En ensayos de hibridación con DNA de *T. cruzi* total, utilizando como sonda cantidades conocidas del fragmento E12 marcado radiactivamente en Dot-blot, se pudo calcular, en función de la cantidad de radiactividad incorporada, que el elemento E12 representa-

ba cerca del 2.5% del total del DNA genoma. En este trabajo consideraron que si el tamaño de E12 es de 1,123 pb y si se asume que el genoma de *T. cruzi* era de 2.5×10^8 pb, entonces se obtendrán del orden de 5.6×10^3 copias del gen (Requena et al 1992). En un estudio publicado dos años después por este mismo grupo, encontraron que este elemento E12 formaba parte de las moléculas transcritas y que se localiza en el RNA poli-(A) y que posiblemente servía como sitio de poli-adenilación. (Requena et al 1994). Con esta información se pudo sugerir que estas secuencias de repetición que se encuentran distribuidas en el genoma, no tan sólo son secuencias “basura” sino que pueden estar involucradas en los procesos de maduración de los RNAm.

Trabajos posteriores identificaron otro elemento de 40 kDa llamado “NL1Tc” o retrotransposon sin repeticiones largas (LTR), el cual codifica para una endonucleasa que reconoce AP (apurínicos-apirimidínicos) de tal forma que es capaz de transponerse y encontrarse disperso por todo el genoma (Martin F et al 1995; Olivares et al 2002).

Otros elementos identificados han sido el DGF-1 que se encuentra aproximadamente en 220 copias por genoma y su tamaño es de 10-12 kb, (Martin et al 1995) el L1Tc de 5 kb y 2000 copias por genoma, que se encuentra disperso en varios cromosomas, reconociéndose además que su secuencia tiene homología con una reverse transcriptasa y una proteína con actividad de RNasa H. En general los LINE poseen marcos de lectura de abierto (ORF) para enzimas que pueden estar involucradas en su propia transposición, no así los SINE que no poseen capacidad para codificar sus propias proteínas y transponerse (Jelinek & Schmidt 1982; Winker et al 1992).

Al secuenciar los genes que codifican para las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, se encontró que algunos de ellos también están arreglados en paquetes de uno tras otro (tándem) y conectados por un nuevo tipo de secuencia de repetición, denominada SIRE (Short Interspersed Repetitive Element: Elementos cortos repetitivos intercalados) de 428 pb que se localizan inmediatamente hacia el extremo 5' de uno de ellos y hacia el extremo 3' del siguiente gen. Estas secuencias de repetición se encuentran distribuidas en todo el genoma entre 1,500-3,000 copias dependiendo de la especie (Vázquez et al 1999) y se encuentran altamente conservadas en *T. cruzi* (Vázquez et al 2000). Por lo que se pensó que estas secuencias de repetición, que se encuentran flanqueando a los genes podrían tener funciones en la regulación de la expresión de éstos.

Ahora, de acuerdo a su distribución dentro del genoma, las secuencias de repetición se han clasificado en dos grupos principales: a) repeticiones agrupadas (clustered repeats) y b) repeticiones dispersas (dispersed repeats). Dentro de las primeras tenemos a los microsatélites, minisatélites y los satélites. Los microsatélites son secuencias de repetición

de 2-5 pb organizadas en grupos, con un tamaño promedio que puede alcanzar hasta los 1,000 pb. Los minisatélites son unidades de repetición de cerca de 15 pb y que pueden tener un tamaño muy variable, que va desde 0.5 a 30 kb. El DNA satélite contiene secuencias de repetición de 200 pb organizadas como megagrupos (clusters) y que están localizados en la región de la heterocromatina de los cromosomas (Requena et al 1996).

Se han identificado familias de transcritos que son elementos interdispersos que se encuentran como RNA con colas de poli-A, éstas son secuencias conservadas, que contienen codones de paro prematuros y que por lo tanto no se traducen en proteínas. Por estudios de Northern-blot se sabe que estos transcritos se encuentran en las formas replicativas del parásito (epimastigotes y amastigotes) y están asociados a elementos móviles, pero a pesar de reconocerse que estas secuencias son abundantes, aún no se conoce exactamente su función (Verbisck et al 2003). Es posible que al replicarse el genoma de *T. cruzi*, también permita que las regiones que contienen a estos elementos de repetición, se vuelvan laxos y faciliten su transcripción y al mismo tiempo se incrementa la posibilidad de rearrreglo y fenómenos de recombinación de genes. Estos elementos autónomos pueden encontrarse distribuidos al azar dentro del genoma, pero de acuerdo a datos recientes se ha permitido reconocer que existen secuencias consenso donde se pueden encontrar con mayor probabilidad (El-Sayed et al 2005).

La localización de estas secuencias de repetición dentro de los cromosomas se ha podido ubicar en la zona subtelomérica. Se sabe que la familia de genes como las transalidasas y otras proteínas de superficie del parásito son también de localización telomérica y subtelomérica. Esta circunstancia es importante, debido a que en las regiones teloméricas es más frecuente que se lleven a cabo fenómenos de recombinación y adquisición de genes heterólogos e incluso que exista expansión de estos genes; aunque recientemente se identificó la presencia de bases modificadas llamadas bases J, que son glucosil-hidroximetil uracilo, que son importantes en la represión de la recombinación de secuencias de repetición o retroelementos, y de esta forma se regula o estabiliza el tamaño del genoma (Ekanayake et al 2007).

En conclusión, el genoma de *T. cruzi* varía en tamaño dependiendo de la cepa y el linaje, contiene sus genes arreglados en paquetes, son policistrónicos y éstos van seguidos uno tras otro (tándem), posee espacios intergénicos donde se pueden encontrar elementos SINE, LINE y satélites. Los datos sugieren que este arreglo genómico está dado gracias a estas unidades de repetición, además de estar involucradas en la regulación y maduración de los RNAs mensajeros, al funcionar como sitios aceptores

para el *trans-splicing*, mecanismo que se comentará también más adelante. Otra característica de este genoma, es que no se han podido identificar secuencias promotoras de la transcripción para los genes que codifican proteínas (Figura 2). De todo ello no cabe duda, que este parásito presenta una gran plasticidad y por lo tanto tiene la capacidad de generar una diversidad muy grande de clones con características muy diferentes entre ellas, lo que posiblemente le permita como especie adaptarse a sus diferentes hospederos.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA

Transcripción

En eucariontes superiores la organización de los genes en la hebra antisentido o complementaria se reconoce que inician en dirección 5' a 3' con una región promotora que regula su transcripción, en donde se encuentra el sitio de inicio de la transcripción, una región no traducible en 5' (llamada 5'-UTR), regiones codificantes (exones) y regiones no codificantes (intrones) intercaladas y una región no traducible en 3' (3'-UTR).

La transcripción en eucariontes puede ser llevada a cabo por distintas RNA polimerasas, y esto dependerá del tipo de gen que se trate, en general se sabe que la RNA pol I transcribe genes ribosomales, la RNA pol II los genes de proteínas y la RNA pol III a los genes de RNA de transferencia y otros RNA pequeños y para que esta transcripción se lleve a cabo es necesario de la participación de factores de transcripción, los cuales reconocen secuencias consenso llamadas promotores de la transcripción. Los promotores para la RNA pol I y la RNA pol II gene-

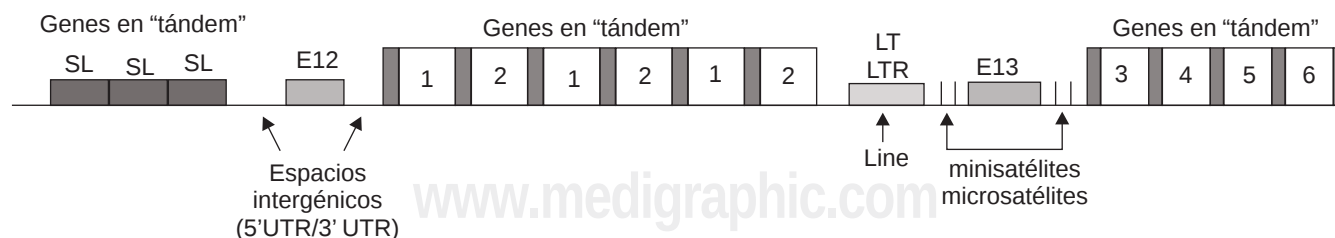
ralmente se encuentran corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, pero para la RNA pol III se encuentra corriente abajo. La unión de estos factores de transcripción y la consecuente formación del complejo DNA-factor transcripción- RNA pol II, es en sí un primer mecanismo de regulación para la expresión de este gene; así entonces se produce la iniciación del transcrito, su elongación y finalizando en el sitio terminador de la transcripción en el extremo 3' del gen. El RNAm que se genera es monocistrónico, sufre un proceso de maduración, que involucra modificación química en el extremo 5' llamado CAP y hacia su extremo 3' una reacción de poliadenilación y una reducción en su tamaño, de donde se eliminan segmentos de RNA llamados intrones, a través de un proceso conocido como "cis-splicing".

En organismos procariontes se tiene una organización parecida, pero no se identifican factores de transcripción, no tienen intrones y generalmente se transcriben los genes de forma grupal (policistrónica) que están funcionalmente relacionados a los que se les llama operones.

Una coincidencia en ambos reinos es la regulación de la expresión por la estructura secundaria que adquiere el RNA en el extremo 3' UTR, visto principalmente en los genes de histonas que no poseen poliadenilación, estructura secundaria de la cual depende la terminación de la transcripción (Lewin 1998).

En tripanosomátidos en general se establece que el tipo de regulación transcripcional es diferente a las previamente planteadas. Se reconoce que la regulación de la expresión de genes en tripanosomátidos, es básicamente postranscripcional y no a nivel del inicio de la misma. Los genes son transcritos en proporción semejante, pero su expresión puede ser diferente dependiendo de la fase

Secuencias repetidas



El genoma tiene un alto grado de secuencias de repetición, entre genes para proteínas, genes para RNA, transposones y retrotransposones. SL: genes para RNA llamados "sílice-líder" importantes en la maduración de los RNAm de proteínas; 5'UTR: Región no traducida en 5' y 3' UTR: Región no traducida en 3' que son regiones importantes en la regulación de la expresión. El genoma contiene repetición de genes en "tándem" para proteínas diversas señalados como 1, 2, 3, 4 5. Repeticiones interdispersas tipo LINE (LTR: Long Terminal Repeat y LT que son retrotransposones. Elementos repetidos interdispersos tipo SINE; E12, E13, que tienen tamaño de 500 pb y se repiten miles de veces. Repeticiones agrupadas tipo micro satélite, mini satélite y satélite que se repiten cientos y miles de veces.

Figura 2. Representación esquemática de la organización genómica de *Trypanosoma cruzi*. (El linaje I de *T. cruzi* contiene 17-22 cromosomas y linaje II con 28-30 cromosomas).

del parásito y del ciclo celular. El control de la expresión se ve afectado por la estabilidad del RNAm, al interactuar éste con las proteínas que se unen a elementos en cis en las regiones 5' y 3' del RNAm o por la eficiencia en las traducción cuando éste selle en ribosomas (Cambell & Sturn 2007).

En tripanosomátidos, el RNAm generado es policistrónico, ya que se co-transcriben varios genes en el mismo RNA, o el mismo gen se puede encontrar varias veces repetido. Este pre-RNAm sufre un proceso de maduración llamado "trans-splicing" y en pocos casos "cis-splicing", este RNAm se poli-adenila en 3' y todos los RNAm maduros llevan hacia 5' una secuencia conocida como SL (splice leader o mini-exón).

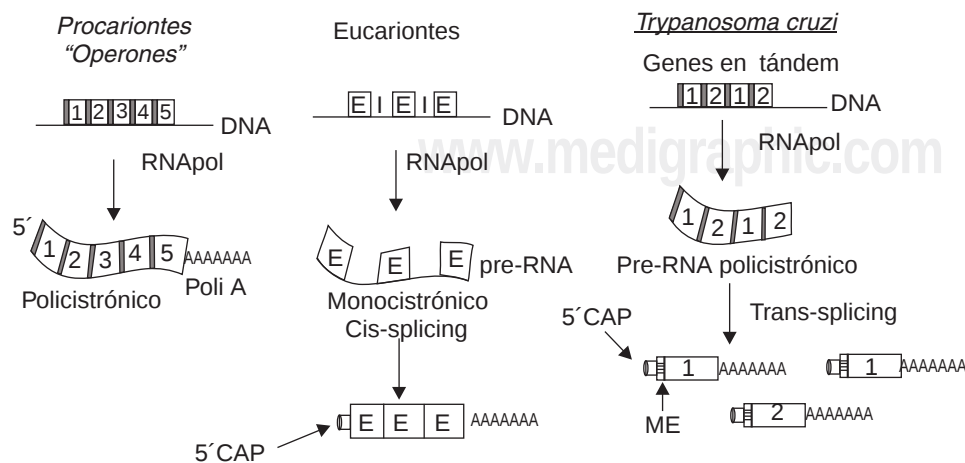
Ha habido grandes esfuerzos para identificar promotores en los genes de los tripanosomátidos. Así se han identificados promotores para el gen RNA ribosomal que es transcrito por la RNA pol I, (Laufer et al 1999), pero poco se ha logrado para identificar los promotores que reconoce la RNapol II que está involucrada en la transcripción de los genes de proteínas.

Por ejemplo se sabe que algunos genes como las glicoproteínas variables de superficie (VSG), las proteínas ácidas repetitivas procíclicas (PARPs) y la fosfogliceratocinasa (PGK) de los tripanosomas africanos, son transcritas de forma policistrónica pero por una RNA pol, a diferencia que en los eucariontes superiores se utiliza la RNA pol II para los RNAm. La polimerasa II posee en su carboxilo terminal un grupo de siete serinas que al parecer es importante para el reconocimiento, mientras que en los tripanosomátidos se carece de esta región. Esta organización policistrónica que implica co-transcripción de varios genes al mismo tiempo y no relacionados funcionalmente entre sí, es diferente a los genes policistrónicos de procariontes, que se organizan en operones y que sí es-

tán relacionados funcionalmente (Graham 1995; Teixeira 1998) (Figura 3).

El análisis de secuenciación de genes ribosomales P en tripanosomátidos reveló que existen de 5 a 6 pb que flanquean los extremos 5' del gen, a estas secuencias se les llamó SIREs (Short Interspersed Repetitive Element), que poseen en sus extremos al parecer, secuencias de inserción similares a los que tienen los transposones. Al analizar los RNAm de los diferentes genes de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, se encontró que hacia su extremo 5' la existencia de secuencias líderes (SL), que normalmente se encuentra en los RNAm maduros de los tripanosomátidos. En dos de estos genes se localizaron los SL a 12 bases corriente arriba del sitio AUG o codón de inicio de la traducción, mientras que en otro de los genes de esta proteína P se ubicaba a 62 bases corriente arriba, sugiriendo la existencia de un mecanismo de transposición (trans-splicing). Así mismo la comparación de las regiones no codificadoras (regiones no traducidas) del extremo 5' del RNAm reveló de la existencia de un sitio aceptor ApG, como también de un aceptor en posición 3' que es precedido corriente arriba de 20 bases de pirimidinas (TTTC) interrumpido por la inserción de secuencias SIRE y un sitio aceptor ApG dentro de este elemento. Todos estos hallazgos permiten apoyar que el fenómeno de translocación (trans-splicing) se puede estar llevando a cabo; además se reconocen secuencias señales para la poli-adenilación (TTTTTAT). Estos hallazgos dan luz sobre el proceso de maduración de los RNAm de *T. cruzi*, y que implica el reconocimiento de estos sitios aceptores para que se lleve a cabo el trans-splicing y que tal vez está asociado también con el proceso de poli-adenilación, para la conversión del RNA policistrónicos en monocistrónicos (Cambell & Sturn 2007).

Aunque en *T. cruzi* se ha observado que la regulación de la expresión de sus transcritos es preferentemente a ni-



En procariontes los genes están organizados en "operones" y se transcriben de forma policistrónica; en eucariontes los genes están discontinuos en forma de exones, separados por intrones, se genera un pre-RNAm monocistrónico que es procesado por "Cis-splicing". En *Trypanosoma cruzi* los genes están arreglados en paquetes que contienen más de un gen diferente y no relacionado funcionalmente. Se genera un pre-RNAm que es procesado por Trans-splicing.

Figura 3. Transcripción en procariontes, eucariontes y en *Trypanosoma cruzi*.

vel postranscripcional, hay evidencia que los genes SL tienen sus propios promotores (Gillinger & Bellofatto 2001; Das & Bellofatto 2003).

Se sabe también que un mecanismo de regulación de la expresión de la transcripción se debe la organización de la cromatina; así en la eucromatina la transcripción es muy activa, no así en la heterocromatina, que se encuentra densamente empaquetada. Los cambios morfológicos del parásito van asociados con cambios en la expresión de diferentes genes. Se ha observado que las fases replicativas presentan mayor cantidad de RNA ribosomal y de RNA poliadenilado, comparativamente con las formas infectantes no replicativas. Aunado a ello, estos cambios correlacionan con cambios en la morfología nuclear, teniendo que en los epimastigotes y los amastigotes que son las fase replicativas, presentan mayor actividad transcripcional, la heterocromatina se acomoda hacia la periferia del núcleo y en los tripomastigotes que es una fase no replicativa, ésta está distribuida por todo el núcleo densamente acomodada (Elias et al 2001).

Esta condición podría explicar el porqué los genes que se encuentran altamente repetidos a lo largo del genoma, se expresan casi igual que los genes en baja copia, ya que probablemente quedan apagados por estar localizados en la heterocromatina; aunque otra posibilidad es que los genes altamente repetidos en el genoma y distribuidos ampliamente, tendrán la posibilidad de transcribirse con mayor probabilidad.

TRANS-SPLICING

En eucariontes superiores, la transcripción de un gen genera un RNAm que lleva segmentos copiados del DNA pero que no serán parte del RNAm que se leerá en los ribosomas, la eliminación de estos segmentos (intrones; en mamíferos hasta 8) y la generación de un RNAm listo para exportarse del núcleo y leerse en los ribosomas, se le llama maduración del pre-RNAm. El mecanismo de cis-splicing que implica la eliminación de los intrones, se puede realizar por una reacción autocatalítica o por la intervención de RNAs pequeños nucleares ricos en ácido uridílico (snRNA U1-U6) que se unen a fragmentos peptídicos formando las snRNPs que catalizan la escisión de intrones. Reconocen para ello secuencias específicas en los intrones, estas secuencias son GT en el extremo 5' y AG en el extremo 3' del intrón y una tercera secuencia CACUGAC localizada hacia el interior del mismo.

El mecanismo de maduración también implica la modificación del extremo 5' del recién sintetizado RNA con la adición de un nucleótido especial en el primer nucleótido, la 7-metil-guanosina-tri-fosfato (m⁷Gppp), llamado CAP y se produce una poli-adenilación (aproximadamente 300

adenosinas) en el extremo 3', señal que sirve para su salida del núcleo y su posterior traducción (Lewin 1998).

En tripanosomátidos se ha reconocido otro mecanismo de generación de RNAm monocistrónicos y listos para su traducción en ribosomas. Este proceso llamado *Trans splicing* fue descrito por primera vez en 1982 en *Trypanosoma brucei* al estudiar el RNAm de las glicoproteínas de superficie y reconocerse que contenían 39 nucleótidos hacia su extremo 5' y posteriormente se reconoció en todos los tripanosomas estudiados (Agabian 1990; Boothroyd & Cross 1982).

En general el mecanismo podría esbozarse de la siguiente manera: El pre-RNAm policistrónico es procesado y cortado al añadirse en su extremo 5' un RNA pequeño nuclear de 30-40 nucleótidos llamado SL, con la ayuda y participación de RNAs pequeños ricos en ácido uridílico (U-sn-RNAs:U1-U5), que contiene hacia su extremo 5' una base modificada 2,2,7-trimetil-guanosina (CAP), estos RNAs pequeños reconocen secuencias llamadas receptoras de AG y otras señales corriente arriba de poli-T en el pre-RNA, con la ayuda de proteínas o factores de unión a estos U-sn-RNAs (Figura 4).

Se han identificado que existen alrededor de 100 copias de genes para estos SL RNA y que se encuentran arreglados en "tándem" y su transcripción está controlada por un promotor corriente arriba (Nunes et al 1997), que poseen un exón altamente conservado mientras que el espacio intergénico es variable. El SL RNA es exportado hacia el citoplasma donde se metila en su extremo 5' y sufre reducción de su tamaño a partir de su extremo 3', además de interaccionar con proteínas. Posteriormente es re-transportado al núcleo para ser utilizado como sustrato en la reacción de trans-splicing (Zaeiner et al 2003). Se sabe que la transcripción del SL se lleva a cabo por la RNAPol II en un sitio particular del núcleo y que por otro lado sucede la transcripción de los pre-RNAm, es decir no son eventos acoplados, la formación del SL y la formación de los RNAm dentro del núcleo (De Macedo & Shenkman 2005).

El SL una vez en el núcleo y en presencia de los U-sn RNAs que se encuentran asociados a proteínas, las cuales son indispensables para cortar el pre-RNAm y transferir el SL al extremo 5' de cada uno de los pre-RNAm, produciéndose así el mecanismo de trans splicing. La estructura secundaria de los SL RNA de todos los organismos es similar, está compuesto de tres asas, la secuencia SL es alrededor de 39 nucleótidos, seguida por un intrón de tamaño variable que forma dos asas y una región de hebra sencilla que contiene una región rica en U llamada sitio Sm que une a las proteínas. El SL RNA en asociación con las U-sn-RNA que reconocen un dinucleótido AG, llamada aceptor y una secuencia de poli-pirimidinas corriente arriba de aproximadamente 60-100 bases del sitio aceptor. En el si-

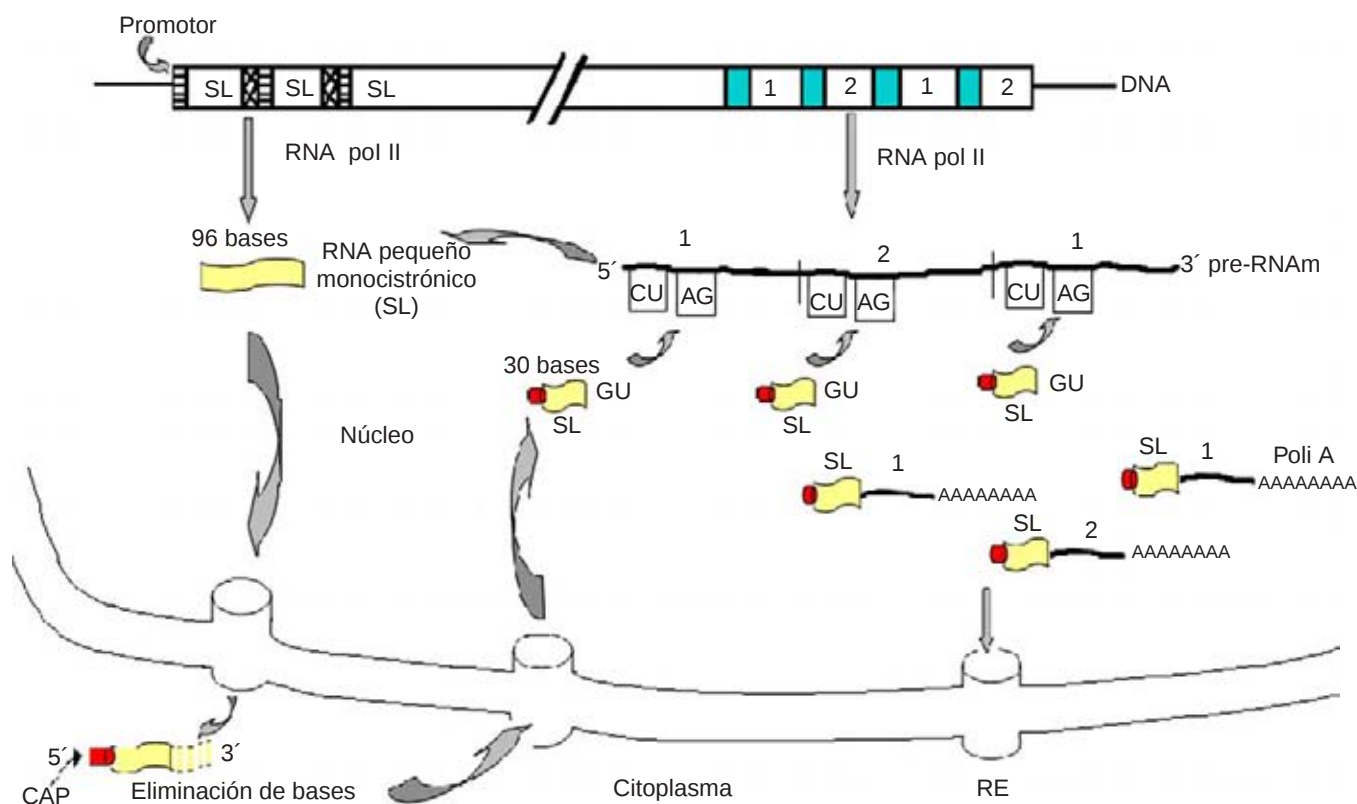
tio aceptor AG se produce la ruptura, quedando incorporado el SL en el 5' del pre-RNAm. Este mecanismo se produce en todas las secuencias internas del pre-RNAm que contenga dichas señales, ya que hay que recordar que este pre-RNAm puede contener información para muchos genes que están acomodados uno tras otro "tándem", posteriormente cada uno de ellos se poli-adenilan en su extremo 3'; generando así tantos RNAm maduros como señales de reconocimiento existan, de tal forma que cada RNAm llevará hacia 5' el SL y hacia 3' la cola de poli-A (Blumenthal 1998; Liang et al 2003).

REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL

A pesar que los genes de *T. cruzi* se co-transcriben en paquetes (clusters), éstos pueden quedar sujetos a una expresión diferencial. Esta regulación puede darse a diferen-

tes niveles: como regulación del procesamiento del transcrito primario (trans-splicing y la poliadenilación), estabilidad del RNAm, almacenamiento y movilización del RNAm hacia los polisomas y su traducción.

En un estudio pionero utilizando la síntesis *in vitro* de proteínas a partir de complejos poli-ribosomales, los mRNAs de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos fueron traducidos y sus productos proteicos se analizaron en geles de dos dimensiones. Se encontró una alta complejidad de proteínas tanto en epimastigotes como en tripomastigotes metacíclicos, pero apreciando diferencias cuantitativas y cualitativas en las proteínas traducidas *in vitro* entre ambos estadios (Goldenberg et al 1985). Si tomamos en consideración que la transcripción de los genes de *T. cruzi* son de tipo policistrónico y que la cantidad de RNAm no está regulada por promotores o factores de transcripción que se unan a dichos sitios, entonces la diferen-



En el mecanismo de trans-splicing el RNAm policistrónico que lleva varios genes, es cortado en cada uno de ellos. El RNA pequeño llamado mini-exón o splice-líder (SL) que se genera a partir de genes en «tándem» y que están regulados por su propio promotor y localizados en otro loci, es transportado este SL hacia el citoplasma y madurado al reducir su tamaño y agregarse hacia 5' una base modificada 2, 2, 7 - trimetil-guanosina (CAP), posteriormente viaja al núcleo e interacciona con el pre-RNAm con la ayuda de RNAs pequeños ricos en ácido uridílico (U-snRNAs:U1-U5), reconocen un dinucleótido AG, llamado aceptor y una secuencia de poli-pirimidinas corriente arriba a 60-100 bases aproximadamente del sitio aceptor en el pre-RNAm de cada gen y así queda insertado este SL o mini-exón en cada una de estas secuencias, generando así un RNA maduro que ahora se dirigirá hacia el citoplasma para ser traducido.

Figura 4. «Trans-splicing» en *Trypanosoma cruzi*.

cia de proteínas traducidas entre las distintas fases del parásito, deberá estar regulada en cualquier otro nivel, como se sugirió anteriormente.

Apoyando esta hipótesis de la expresión diferencial de genes en diferentes estadios del parásito, se encontró que la mucina, una glicoproteína membranosa asociada a glicosilfosfatidil inositol, aislada de epimastigotes y de tripomastigotes metacíclicos era diferente dependiendo la fase del parásito. Un RNAm de 0.8 Kb en los tripomastigotes codifica para regiones ricas en treonina, que favorece la glicosilación de la proteína, mientras que el RNAm de los epimastigotes es de 1 Kb pero presenta mayor heterogeneidad y es susceptible de eliminación de regiones o secuencias inmediatamente después de su traducción, generando de esta forma un contenido más pequeño y variable de treoninas y por lo tanto de la glicosilación y con ello de la proteína misma (Feitas-junior et al 1998).

La amastina es un gen que se encuentra en "tándem" de cerca de ocho genes, que se transcribe constitutivamente en todos los estadios del parásito, pero se expresa de forma más abundante en los amastigotes. Se encontró que dentro de este "cluster" de genes de la amastina existía otro gen al que denominaron tuzina. Estos genes son transcritos en un RNAm policistrónico, con copias intercaladas de amastina y tuzina, separadas por una región intergénica de 145 pb. Pero que a pesar de expresarse a nivel transcripcional en la misma cantidad, no existe la misma concentración a nivel proteico, ya que se encuentra en menor cantidad de tuzina que la amastina en los amastigotes.

Al analizar las distintas regiones del RNAm, como los extremos 5'UTR, 3'UTR y los espacios intergénicos en ensayos de transfección y luciferasa, se encontró que estas regiones eran importantes para regular su vida media, su grado de traducción y por ello su expresión diferencial. El gen de amastina posee un 5'UTR corto y su 3'UTR es más largo comparado al gen de la tuzina, lo que sugiere que estas regiones pudieran estar involucradas en el control de la expresión (Tyler-Cross et al 1995; Teixeira et al 1995; Rodrigues-Ávila et al 2001).

En otro trabajo se estudió la expresión diferencial, en la fase de transición de epimastigotes hacia tripomastigotes metacíclicos (metacicloogénesis) utilizando el método de representación de expresión diferencial (RDE) que implica la hibridación sustractiva de DNAs complementarios llamados guía, de poblaciones relacionadas seguida de una PCR con oligonucleótidos específicos para los DNAs complementarios de la muestra llamada de prueba, para amplificar una población celular específica; se propone este método como un sistema útil de aislamiento y clonación para genes expresados diferencialmente. Se encontró que había una molécula de RNA de 630 bases en los polisomas de los epimastigotes en proceso de diferenciación a metacíc-

licos, que no se encontraba presente en los epimastigotes no diferenciados y al clonar este fragmento y utilizarlo como sonda, se encontró que el RNA total en ambas fases estaba a una concentración similar, pero en los epimastigotes en proceso de diferenciación este RNAm se movilizaba hacia los polisomas, lugar donde se traduce, no así en los epimastigotes, provocando con ello una expresión diferencial de esta proteína en epimastigotes en proceso de metacicloogénesis (Dos Santos & Buck 2000).

Debido a la complejidad que presenta el sistema transcripcional de *T. cruzi*, que ha sido difícil de reconocer promotores para los genes de proteínas, se han utilizado nuevos enfoques para aislar genes específicos en determinado momento o fase celular, además de los ya comentados. Un método utilizado para probar la regulación de genes es mediante la manufactura de sistemas de expresión externos para promotores conocidos, por ejemplo el promotor modificado de rRNA o el promotor del SL, flanqueados con genes de resistencia a antibióticos ya sea tetraciclina o neomicina, que se encuentran unidos a genes reporteros como la cloramfenicol amino transferasa (CAT), la proteína verde fluorescente, (GFP), con luciferasa o con RNAi (RNA de interferencia/antisentido). Con estas construcciones se transfectan epimastigotes ya sea de forma transitoria o de forma estable y se comparan con las construcciones que lleva el promotor del bacteriófago T7 flanqueado por el gen de resistencia a tetraciclina. Este tipo de trabajo ha permitido concluir que las construcciones que lleva el promotor del rRNA es varias veces más estable en estas transfecciones que las que incluyen el promotor para SL, aun en los pases de la construcción entre bacterias, insectos y ratones (Dos Santos & Buck 2000; Tyler-Cross et al 1995; Wen et al 2001; Da Rocha et al 2004).

Existe evidencia de que elementos en cis localizados en la región 3'UTR, que son ricos en G, denominados GRE por sus siglas en inglés, están constituidos por dos pentámeros de GGGGG, que es la región donde se unen las proteínas que promueven su estabilización o de proteínas que al unirse promueven su degradación, además de regiones ricas en AU (adenina-uridina) llamadas por sus siglas en inglés elementos ARE. Estas regiones fueron identificadas en los transcritos de los genes de mucinas, al utilizar los ensayos de retardo en corrimiento de movilidad electroforética, que se produce cuando el RNAm está unido a proteínas nucleares o citoplásmicas. Estas proteínas fueron específicas para cada estadio o fase del parásito y reconocidas como: E-ARE-BPs, para epimastigotes y T-ARE-BPs para tripomastigotes, lo cual sugirió que existe una regulación fina a nivel postranscripcional y que responde al estímulo de la diferenciación. Hacia el extremo 5'UTR también se localizaron regiones que son reguladores de la expresión (De Lange et al 1984; Graham 1995; Roditi

1996; Furger et al 1997; Teixeira et al 1999; Di Noia et al 2000; D'Orso & Frasch 2001; Bartholomeu et al 2002).

Otro mecanismo propuesto para explicar esta expresión diferencial de genes que son co-transcritos de forma poli-cistrónica, deriva de estudios realizados durante la metaciclogenesis con el "cluster" o grupo de genes de la metaciclogenina y de la proteína que se une a quitina, parece ser que su regulación diferencial también depende de la posibilidad de movilización del RNA procesado hacia los polisomas, ya que se ha sugerido que éstos pueden ser almacenados en algún lugar de la célula, para posteriormente moverse hacia los polisomas, donde serían traducidos (Dellagiovanna et al 2001; Rodrigues-Ávila et al 2003) (Figura 5).

Para estudiar la expresión diferencial de estos RNAm también se han utilizado microarreglos. En esta técnica se

imprime en un soporte de vidrio secuencias de DNA de diferentes genes y se hibridan con sondas de cDNA unidas a fluorocromos, las cuales provienen de los RNAm de las células en estudio. La variación de la intensidad de la fluorescencia será proporcional a la cantidad de RNAm presente en cada fase. El empleo de esta técnica ha permitido detectar expresión diferencial entre las distintas fases del parásito (Minning et al 2003).

En resumen, la transcripción de los genes estructurales en *T. cruzi*, en general es de forma constitutiva, transcritos a una misma proporción o cantidad, en forma policistrónica como RNAs precursores o inmaduros. Estos genes están acomodados en grupos o paquetes y seguido uno tras otro con espacios intergénicos cortos. Tienen además una característica inusual, es decir hay una aparente ausencia de

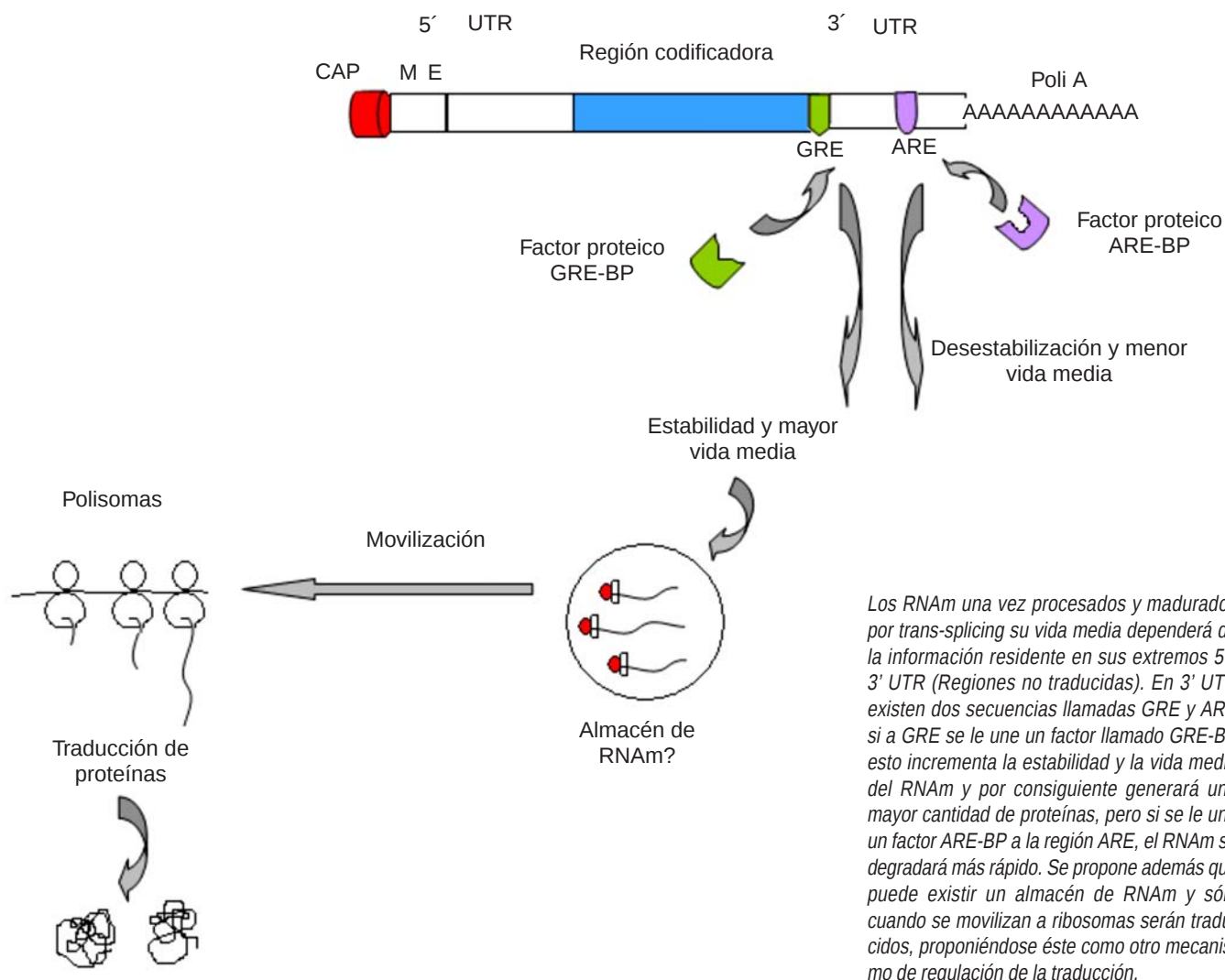


Figura 5. Regulación postranscripcional en *Trypanosoma cruzi*.

secuencias promotoras al inicio de estos grupos o paquetes de genes y son transcritos por la RNA pol II. Los cuales son procesados en RNAm individuales seguido de la adición de un fragmento de 39 nucleótidos (SL) en su extremo 5' vía un mecanismo de trans-splicing o una cola de polia-A en su extremo 3'. La expresión de estos genes en *T. cruzi* al parecer es básicamente regulada a nivel post-transcripcional y que puede ser a nivel del transcrito primario, estabilidad del mRNA o estabilidad del producto de traducción.

Los snRNAs conservados U2, U3, U4 y U6 tienen un papel en el trans-splicing del SL y el cis-splicing, que aunque se presenta, no es el más común para madurar a los RNAm. Se ha reconocido que la regulación en la expresión es básicamente postranscripcional, radicando ésta en los extremos 3'-UTR, 5'-UTR y los espacios intergénicos del transcrito. La estabilización del RNA transcrito puede ser a través de proteínas de unión estabilizadoras que reconocen a la región llamada de control positivo, pero si se unen proteínas específicas a la región de control negativo, entonces se favorece su degradación. Otro mecanismo propuesto es el almacenaje del RNA maduro en un compartimento celular antes de movilizarse hacia los polisomas.

Todas estas particularidades ofrecen una alternativa para generar blancos terapéuticos, ya sea interviniendo en el mecanismos de trans-splicing, en las proteínas o factores reguladores de la vida media de los RNAm.

Como se puede apreciar la regulación postranscripcional parece ser la de mayor impacto en la regulación de la expresión de genes en *T. cruzi* y muy probablemente en otros tripanosomátidos; aunque en *T. cruzi* no se ha reconocido la secuencia de Shine-Dalgarno o sitio de unión a ribosomas (5'AGGAUGGU 3') que suele localizarse de 3-10 nucleótidos corriente arriba del primer codón que se traduce como AUG o GUG o UUG; aquí la necesidad de generar mayor conocimiento de estos mecanismos post-transcripción, ya que permitirían establecer blancos terapéuticos, ya que los fármacos tripanomicidas existentes como el bencimidazol y el nifurtimox tienen una acción muy limitada y muchas reacciones adversas.

La organización de su genoma con secuencias de repetición tan alta, con la existencia de transposones, el probable intercambio genético, son uno de los retos más importantes cuando se desea confinar a la población de parásitos en un grupo definido, ya sea por sus características biológicas, bioquímicas o fisiológicas, e inclusive genéticas, ya que la variación en el tamaño de su genoma, producto de inserciones o eliminación de fragmentos de DNA o de cromosomas completos, hace que las cepas de una región a otra presenten características diferentes y este polimorfismo, complica la intención de agrupar a los parásitos en grupos bien definidos, razón por lo cual, hasta la fecha no se ha podido

establecer qué tipo de cepas de *T. cruzi* son las patógenas y cuáles no lo son, como tampoco el identificar y asociar algún grupo taxonómico ya sea del grupo I o II con la resistencia natural a los fármacos antiparasitarios. Mas sin embargo con la generación de todo el conocimiento a nivel molecular del parásito, es muy probable que en corto tiempo se identifiquen los factores de virulencia, las enzimas claves en su metabolismo, los componentes importantes en su fisiología y cómo éstas se encuentran presentes en las diferentes cepas del parásito.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo parcialmente apoyado con Fomix Campeche-CAMP-2005-C01-023.

REFERENCIAS

1. Agabian, N. 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61:1157-1160.
2. Andersson, B., L. Aslund, M., A. Tammi., A. Tran., J. Hoheisel & U. Pettersson. 1998. Complete sequence of a 93.4 Kbp contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand switch region. *Genome Res* 8:809-816.
3. Anonymus. 1999. Mem Inst Oswaldo Cruz 94:429-431.
4. Arner, E., E. Kindlund., D. Nilsson., F. Farzana., M. Ferella., M. Tammi. & B. Andersson. 2007. Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20 000 additional gene variants. *BMC Genomics* 8:391-405.
5. Bartholomeu DC., RA. Silva, L. Galvão., N. El-Sayed, JE. Donelson & S. Teixeira. 2002. *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. *Exp Parasitol* 102:123-133.
6. Blumenthal T. 1998. Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *BioEssays* 20:480-487.
7. Boothroyd JC. & GA. Cross. 1982. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosma brucei* have a short identical exon at their 5' end. *Gene* 20:281-289.
8. Cambell DA. & NR. Sturn. 2007. The untranslated region of genes from *Trypanosoma cruzi*: perspectives for functional characterization of strains and isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:577-578.
9. Castro C., SP. Craig & M. Castaneda. 1981 Genomic organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi* *Mol Biochem Parasitol* 71:273-282.
10. Da Rocha WD., K. Otsu, SM. Teixeira & JE Donelson. 2004. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 133:175-186.
11. Das A & V. Bellofatto. 2003. RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:80-85.
12. Deininger PL & GR. Daniels. 1986. The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements. *Trends Genet* 2:76-80.
13. De Lange T., TM. Berkvens, HJ. Veerman, AC. Frasch, JD. Barry & P. Borst. 1984. Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic Acids Res* 12:4431-4443.

14. Dellagiovanna B., C. Plazenet-Menut, S. Ogatta, A. Avila, M. Krieger & S. Goldenberg. 2001. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp Parasitol* 99:7-16.
15. De Macedo DF. & S. Shenkman. 2005. Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell* 4:960-970.
16. Di Noia JD., ID. D'Orso, DO. Sánchez & AC. Frasch. 2000. AU-rich element in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem* 275:10218-10227.
17. D'Orso I. & A. Frasch. 2001. Functionally different AU- and G- rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J Biol. Chem* 276:15783-15793.
18. Dos Santos W. & GA. Buck. 2000. Simultaneous expression of neomycin phosphotransferase and green fluorescence protein genes in *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol* 86:1281-1288.
19. Dvorak JA. 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biol* 24:357-371.
20. Ekanayake, D., M. Cipriano., & R. Sabatini. 2007. Telomeric co-localization of the modified base J and contingency genes in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Nucl Acid Res* 35: 6367-6377.
21. Elias M., R. Marquez-Porto, E. Freymüller & S. Schenkman. 2001. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 112:79-90.
22. Epplen JT. 1992. Diagnostic application of repetitive DNA sequences. *J Int Fed Clin Chem* 4:228-234.
23. El-Sayed, N., P. Myler., D. Bartholomeu., D. Nilsson., G. Aggarwal., A. Tran., E. Ghedin., E. Worthey., et al .2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309:409-415.
24. Feitas-Junior LHG., MR. Briones & S. Schenkman. 1998. Two distinct groups of mucin-like genes are differentially expressed in the development stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 93:101-114.
25. Fernandes AP., K. Nelson & SM. Beverly. 1993. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci* 90:11608-11612.
26. Fernandes O., RH. Mangia., CV. Lisboa., AP. Pinho., CM. Morel., B. Zingales., DA. Campbell & Jansen. 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitol* 118:161-166.
27. Furger A., N. Schürch, U. Kurath & I. Roditi. 1997. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Biol* 17:4372-4380.
28. Gillinger G. & V. Bellofatto. 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res* 29:1556-1564.
29. Goldsmith R, R. Zárate, I. Kagan, J. Cedeño, M. Galindo-Vasconcelos, & E. Raz 1978. El potencial de la transmisión en la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea: hallazgos serológicos entre donadores en el estado de Oaxaca. *Salud Publica Mex* 10:439-444.
30. Goldenberg S., JM. Salles, VT. Contreras, MP. Lima Franco, AM. Katzin, W. Colli & CM. Morel. 1985. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett* 180:265-270.
31. Gomez E., AM. Valdes., D. Pinero & R. Hernandez. 1991. What is a genus in the trypanosomatidae family? Phylogenetic analysis of two small rRNA sequences. *Mol Biol Evol* 8:254-259.
32. Graham SV. 1995. Mechanisms of sage-regulated gene expression in kinetoplastidia. *Parasitol Today* 11:217-223.
33. Guzmán Bracho C., L. García García, J. Floriani Verdugo, S. Guerrero Martínez, M. Torres Cosme, C. Ramírez Melgar & O. Velasco Castrejón. 1998. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transmisión de sangre en México. *Rev Panam Salud Publica* 4: 94-102.
34. Guzmán-Bracho C, S. La Huerta & O. Velasco-Castrejón. 1998. Chagas disease. First congenital case report. *Arch Med Res* 29:79-82.
35. Hamilton PB., J. Stevens, M. Gaunt, J. Gidley & W.Gibson. 2004. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol* 34:1393-1404.
36. Henriksson J., L. Aslund & U. Pettersson. 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 12:108-114.
37. Heras, S., M. López., M. Olivares & C. Thomas. 2007. The L1Tc non-LTR retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* contains and internal RNA-pol II-dependent promoter that strongly activates gene transcription and generates unspliced transcripts. *Nucleic Acids Res* 35:2199-2214.
38. Jelinek WR & CW Schmidt. 1982. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu Rev Biochem* 51:813-844.
39. Lanar DF., LS. Levy & E. Manning. 1981. Complexity and content of the DNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 3:327-341.
40. Laufer G., G. Schaaf, S. Bollgons & A. Günzl. 1999. *In vitro* analysis of α -amanitin-resistant transcription from the rRNE, procyclic acidic repetitive protein and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 19:5466-5473.
41. Lewin, B., *Genes VI*, 1ª Ed, Reimpresión, U.S.A., Oxford University Press, 1998.
42. Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Bioch Parasitol* 138:131-141.
43. Liang H., A. Haritan, S. Uliel & S. Michaeli. 2003. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors and regulation. *Eukaryot Cell* 2:830-840.
44. Machado CA & FJ. Ayala. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7396-7401.
45. Martin F., C. Marañón, M. Olivares, C. Alonso, M. López. 1995. Characterization on non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with ape family of DNA repair enzyme. *J Mol Biol* 247:49-59.
46. Mazariego-Arana MA, VM. Monteón, MA.Ballinas-Vardugo, N. Hernández-Becerril, R. Alejandro-Aguilar & PA. Reyes 2001. Seroprevalence of human *Trypanosoma cruzi* in different geographic zones of Chiapas, México. *Rev Soc Bra Med Trop* 34:453-458.
47. Mazzoti L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. *Gac Med Mex* 70:417-420.
48. Minning TA., J. Bua, GA. Garcia, RA. McGraw & R Tarleton. 2003. Microarray profiling of gene expression during trypanomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 131:55-64.
49. Monteón-Padilla VM, N. Hernández-Becerril, C. Guzmán-Bracho, JL. Rosales-Encina & PA. Reyes-López. 1999. American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) and blood banking in Méxi-

- co City: seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. Arch Med Res 30: 393-398.
50. Monteón-Padilla VM, C. Negrete García & PA Reyes López. 1996. Chronic chagasic cardiopathy with parasitemic state (preliminary report). Arch Med Res 27:335-337.
 51. Morel C, E. Chiari E., EP. Camargo., DM. Mattei., AJ. Romanha & L.Simpson. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci 77:6810-6814.
 52. Nunes LR., MR. Carvalho, AM. Shakarian & GA .Buck. 1997. The transcription promoter of the spliced lider gene from *Trypanosoma cruzi*. Gene 188:157-168.
 53. Obado, S., M. Taylor., S. Wilkinson., E. Bromley & J. Kelly. 2005. Functional mapping of a trypanosome centromere by chromosome fragmentation identifies a 16-kb GC-rich transcriptional "strand-switch" domain as major feature. Genome Res 15:36-43.
 54. Olivares M., C. Alonso & MC. López. 1997. The open reading frame 1 of the L1Tc retrotransposon of *Trypanosoma cruzi* codes for a protein with apurinic-apyrimidinic nucleases activity. Journ Biol Chem 272:25224-25228.
 55. Olivares M., JL.García-Pérez, C. Thomas, SR. Heras & MC. López. 2002. The non-LTR (long terminal repeat) retrotransposon L1Tc from *Trypanosoma cruzi* codes for a protein with RNase H activity. J Biol Chem 277:28025-28030.
 56. Olivares-Villagomez D, TL. Mccurley, CL.Vnenkak-Jones, R. Correa-Oliveira, DG. Colley & Carter CE. 1998. Polymerase chain reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences for human chagasic cardiac tissue. Am J Trop Med Hyg 58:715-720.
 57. liveira RP, NE. Broude., AM. Macedo., CR. Cantor., CL. Smith & SD. Pena. 1998. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci 95:3776-3780.
 58. Ramos-Echevarria AA, VM. Monteón-Padilla & PA. Reyes-López. 1993. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. Salud Publica Mex 35: 56-64.
 59. Rangel-Flores H, B. Sánchez, J. Mendoza-Duarte, C. Barnabé, FS. Brenieré & C. Ramos. 2001 Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of Central Mexico: correlations with electrocardiographic alterations. Am J Trop Med Hyg 65:887-895.
 60. Requena JM., A. Jimenez-Ruiz, M. Soto, MC. López & C. Alonso. 1992. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. Mol Biochem Parasitol 51:271-280.
 61. Requena JM., F. Martin, M. Soto, MC. López & C. Alonso. 1994. Characterization of a short interspersed reiterated DNA sequence of *Trypanosoma cruzi* located at the 3'-end of poly(A)⁺ transcript. Gene 146:245-250.
 62. Requena JM., MC. López & C. Alonso. 1996. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today 12:279-283.
 63. Roditi I. 1996. The VSG-Procyclin switch. Parasitol Today 12:47-48.
 64. Rodrigues-Ávila A., SF. Yamada-Ogatta, V. da Silva Monteiro, MA. Krieger, Vataru C. Nakamura, W. de Souza & S. Goldenberg. 2001. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, wich is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol 117:169-177.
 65. Rodrigues-Ávila A., B. Dellagiovanna, S. Yamada-Ogatta, V. Monteiro-Góes, S. Perdigo-Fragoso, M. Krieger & S. Goldenberg. 2003. Stage-specific gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Genet Mol Res 2:159-168.
 66. Salazar Schetino PM., I. de Haro Arteaga & T. Uribarren Berruela. 1988. Chagas disease in México. Parasitol Today 4: 348-351.
 67. Sánchez-Guillén MC, C. Branabé., JF. Guégan, M. Tibayrenc., M. Velázquez-Rojas, J. Martínez-Munguía, H. Salgado-Rosas, E. Torres-Rasgado, MI. Rosas-Ramírez & R. Pérez-Fuentes. 2002. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the state of Puebla, a non-endemic area of México. Mem Inst. Oswaldo Cruz 97: 947-952.
 68. Sloof P., JL. Bos, AF. Konings, HH. Menke, P. Borst, W. Gutteridge & W. Leon. 1983. Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. J Mol Biol 167:1-21.
 69. Solari AJ. 1980. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. Chromosomes 78:239-255.
 70. Sosa-Jurado F, M. Mazariego-Aranda, N. Hernández-Becerril, V. Garza-Murillo, M. Cárdenas, PA. Reyes, K. Hirayama & VM. Monteón. 2003 Electrocardiographic findings in Mexican chagasic subject living in high and low endemic regions of *Trypanosoma cruzi* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 98:605-610.
 71. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA & Zingales B: DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1996; 83: 141-152.
 72. Tay J, PM. Salazar-Schettino, M. Bucio, R. Zarate & L. Zarate. 1981. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Salud Publica Mex 22:409-450.
 73. Teixeira SMR., LV. Kirchhoff & JE. Donelson. 1995. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the amastin/tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. J Biol. Chem 270:22586-22594.
 74. Teixeira SMR. 1998. Control of gene expression in *Trypanosomatidae*. Braz. J Med Biol Res 31:1503-1516.
 75. Teixeira SMR., LV. Kirchhoff & JE. Donelson. 1999. *Trypanosoma cruzi*: suppression of tuzin gene expression by its 5'-UTR and spliced leader addition site. Exp Parasitol 93:143-151.
 76. Tibayrenc M & F. Ayala. 1987. *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. Parasitol Today 13:189-190.
 77. Tibayrenc M, F. Kjellberg & FJ Ayala. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci 87: 2414-2418.
 78. Tibayrenc M, K. Neubauer., C. Barnabe., F. Guerrini., D. Skarecky & FJ. Ayala 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. Proc Natl Acad Sci 90:1335-1339.
 79. Tibayrenc M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Adv Parasitol 36:47-115.
 80. Trujillo Contreras F, F. Lozano Kasten, MM. Soto Gutiérrez & R. Hernández Gutiérrez. 1993. Prevalencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del estado de Jalisco, México. Rev Soc Bras Med Trop 26:89-92.
 81. Tyler-Cross RE., SL. Short, LM. Floeter-Winter & G. Buck. 1995. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. Mol Biochem Parasitol 72:23-31.
 82. Vargas, N., A. Pedroso & B. Zingales. 2004. Chromosomal polymorphism, gene synten and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. Mol Biochem Parasitol 138: 131-141.
 83. Vázquez, M., C. Ben-Doc, H. Lorenzi, H. Moore, A. Schijman & MJ. Levin. 2000. The short interspersed repetitive element of *Trypanosoma cruzi*, SIRE, is part of VIPER, an unusual retroelement related to long terminal repeat retrotransposons. Proc Natl Acad Sci USA . 97:2128-2133.
 84. Vázquez M., H. Lorenzi, AG. Schijman, C. Ben-Dov & MJ. Levin. 1999. Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of *Trypanosoma cruzi*. Gene 239:207-216.

85. Velasco-Castrejon O & C. Guzmán-Bracho. 1986. Importancia de la enfermedad de Chagas disease en México. Rev Latinoam Microbiol 28:275-283.
86. Velasco-Castrejon O, JL. Valdespino., R. Tapia-Coyer., B. Salvatierra., C. Guzmán Bracho., C. Magos., G. Llausás., G. Gutiérrez & J. Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Salud Publica Mex 34:186-196.
87. Verbisck NV., MR. Machado dos Santos, DM. Ehgman, MA, Chiurillo, JL. Ramirez, JE. Araya, RA. Mortara & JF. Da Silveira. 2003. A novel reiterated family of transcribed oligo (A)-terminated interdispersed DNA elements in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98:129-133.
88. Vidal Acosta V, S. Ibáñez-Bernal & Martínez-Campos C. 2000. Infección natural de chinches triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Publica Mex 42:496-503.
89. Wagner W & So M. 1990. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. Infect Immun 58:3217-3224.
90. Wen, L., P. Xu., G. Benegal, M. Carvaho, D. Butler & G Buck. 2001. *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression. Exp Parasitol 97:196-204.
91. Winker P., AC.Murto-Dovales & S. Goldenberg. 1992. Nucleotide sequence of a representative member of a *Trypanosoma cruzi* dispersed gene family. Mol Biochem Parasitol 55:217-220.
92. Zaeiner, GM., NR. Sturm & DA. Campbell. 2003. Exportin 1 mediates nuclear export of the kinetoplastid spliced leader RNA. Eukaryot Cell 2: 222-230.

Correspondencia:

Víctor Monteón Padilla

Centro de Investigación Enfermedades Tropicales,
 Universidad Autónoma de Campeche,
 Av Patricio Trueba s/n,
 Col Linda Vista, Campeche, Campeche 24090.
 Tel/Fax 981-81-30176.
 E-mail: victormonteon@yahoo.com.mx