



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



**Generación de líneas celulares
con edición genómica para el estudio funcional
de un miembro de la familia multigénica GP63
en *Trypanosoma cruzi***

María José Díaz

Tesina de grado, Licenciatura en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Tutoras: Dras. Adriana Parodi Talice y María Laura Chiribao

Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno, Institut Pasteur de Montevideo

Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias

“No estalla como las bombas ni suena como los tiros.

Como el hambre, mata callando.

*Como el hambre, mata a los callados: los que viven condenados al silencio y mueren
condenados al olvido.*

Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende...

*El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que
interese a los políticos ni a los periodistas.*

Elige a sus víctimas en el pabrerío.

Las muerde y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas.

Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen.

Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren...”

Eduardo Galeano

(Chagas, una tragedia silenciosa,
Médicos Sin Fronteras. Editorial Losada, 2005)

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer profundamente a mis tutoras, Adriana y María Laura, por haber confiado en mí y haberme recibido en su proyecto. Gracias por compartir con tanta paciencia sus conocimientos, críticas y reflexiones, por su dedicación constante y por el enorme cariño con el que me acompañaron. Sinceramente no podría haber pedido mejores orientadoras.

A los miembros del Laboratorio de Interacciones Hospedero-Patógeno, por estar dispuestos a ayudarme cuando lo necesité y por la buena energía siempre. A todos los funcionarios e investigadores que hacen del Institut Pasteur un lugar de trabajo tan agradable.

A mi familia por su apoyo incondicional: a mi querida abuela, a mis primos, a Blanca, Susana, Ale y mis padrinos. A mi hermana, con quien tengo los mejores recuerdos: aunque nos separe un océano, siempre vas a ser mi mejor amiga. A mis padres, que me han alentado incansablemente, aconsejándome en mis momentos de incertidumbre y celebrando cada uno de mis logros. Gracias por los sacrificios que hicieron pensando siempre en mi educación.

A Pepe, por darme el amor más puro y por las mañanas de estudio compartidas tomando los mejores mates (los suyos), crecer juntos ha sido un privilegio.

A mis amigas y compañeras, las viejas y las nuevas, todas, que hicieron la facultad y la vida más livianas y divertidas en cada etapa: gracias por los resúmenes, las cenas y las charlas.

A Marila y Astrid, por todo lo que me enseñaron para la ciencia y para la vida. A Eduardo por sus valiosos consejos a lo largo de la carrera.

Gracias al Laboratorio de Interacciones Moleculares por incluirme con tanta calidez, y especialmente a Leticia y Santiago, por guiarme en mis primeras experiencias de laboratorio y contagiarme su entusiasmo por la biología molecular.

Agradezco también al tribunal por aceptar dedicar su tiempo a la lectura y corrección de este trabajo final de grado.

Finalmente, no puedo más que agradecerle a mi casa de estudios, a la Facultad de Ciencias, y a todos quienes la conforman y hacen de ella un lugar tan apasionante. Gracias por ser un segundo hogar, por permitirme ser, sentir, cuestionar y disfrutar. Y gracias, sobre todo, a la educación pública, que nos ha dado a tantos el privilegio de formarnos en lo que amamos y aprender de semejantes docentes.

A todas y todos los que me acompañaron en este proceso, en estos años de estudio, aprendizajes y crecimiento: gracias.

Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, continúa siendo un importante problema sanitario en América Latina, con un tratamiento limitado y poco efectivo en la etapa crónica. Si bien se ha avanzado en la comprensión del ciclo de vida del parásito y de los mecanismos que utiliza para invadir y persistir en el hospedero, muchas de las proteínas involucradas en estos procesos no han sido caracterizadas en profundidad. Una de ellas es la metaloproteasa GP63, cuya función ha sido ampliamente estudiada en *Leishmania spp.* donde se ha asociado a funciones clave en la invasión celular y evasión del sistema inmunológico.

Este trabajo se centró en el análisis funcional del grupo 2 (G2) de GP63 en *T. cruzi*, con el objetivo de explorar su participación en el proceso infeccioso. Para ello, se utilizó la metodología de edición genómica CRISPR-Cas9 para generar líneas mutantes deficientes en G2, empleando guías específicas dirigidos a los genes blanco y utilizando ADN donador conteniendo genes de resistencia a antibióticos. La edición se evaluó mediante PCR para comprobar el reemplazo génico y por RT-qPCR, donde el ARNm de G2 fue indetectable, lo que sugiere una sustitución exitosa de ambos alelos por los genes de resistencia.

Los ensayos funcionales realizados permitieron evidenciar alteraciones fenotípicas en los mutantes, con una disminución en la capacidad de invasión celular y en la cantidad de tripomastigotas en el sobrenadante de células infectadas. Estos resultados abren nuevas preguntas sobre el rol específico de G2 en el ciclo celular y en la virulencia de *T. cruzi*. Asimismo, se plantea como perspectiva el abordaje de estrategias complementarias para avanzar en la caracterización funcional de esta familia, tales como el estudio de la localización subcelular y la actividad proteasa de G2, la sobreexpresión de versiones salvajes y mutantes del sitio activo, y el análisis interactómico con células hospederas.

Este estudio aporta evidencia sobre el rol de la familia multigénica GP63 de *T. cruzi*, destacando la importancia del grupo G2, en la interacción con el hospedero y su potencial como blanco terapéutico para el control de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; interacción parásito-hospedero; familia multigénica GP63; CRISPR-Cas9.

Tabla de contenidos

Listado de tablas.....	6
Listado de figuras.....	6
Introducción.....	8
1. Enfermedad de Chagas.....	8
1.1. Manifestaciones clínicas.....	8
1.2. Patogénesis.....	9
1.3. Tratamiento.....	10
1.4. Transmisión.....	10
1.5. Epidemiología.....	12
2. Trypanosoma cruzi.....	13
2.1. Ciclo de vida.....	13
2.2 Mecanismos de invasión.....	16
2.3. Genoma y familias multigénicas.....	18
2.4. Familia GP63.....	19
3. Sistema inmune CRISPR-Cas9.....	23
3.1. Origen y mecanismo.....	23
3.2. Aplicación en bioingeniería.....	24
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
Materiales y métodos.....	28
1. Diseño del sistema CRISPR-Cas9.....	28
2. Generación de los ADN donador y los sgRNA.....	29
3. Manipulación de ácidos nucleicos.....	32
3.1. Diseño de cebadores.....	32
3.2. Extracción de ADN genómico.....	33
3.3. PCR a tiempo final para verificar edición.....	33
4. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR.....	34
4.1 Extracción de ARN total.....	34
4.2 Síntesis de cDNA y RT-qPCR.....	35
5. Cultivo de parásitos y líneas celulares.....	36
6. Transfección y selección de los epimastigotas.....	37
7. Aislamiento clonal por deposición de célula única.....	37
8. Curva de crecimiento de epimastigotas.....	38
9. Metaciclogénesis in vitro.....	38
10. Ensayos de infección in vitro.....	38
10.1 Protocolo de infección con tripomastigotas metacíclicos.....	38
10.2. Cuantificación de tripomastigotas en sobrenadante.....	39

10.3. Análisis de la capacidad de invasión y replicativa.....	39
10.4. Inmunofluorescencia indirecta.....	40
Resultados.....	41
1. Selección de miembros de GP63 como blancos para la edición genómica.....	41
2. Generación de mutantes mediante CRISPR-Cas9.....	43
2.1 Diseño y generación del sistema de edición.....	43
2.2 Transfección y selección de epimastigotas.....	46
3. Caracterización molecular de las líneas generadas.....	47
3.1 PCR para detectar la integración del ADN donador.....	47
3.2. Clonación mediante deposición de células individuales.....	50
3.3. Cuantificación de la expresión de G2.....	51
4. Evaluación funcional de la línea deficiente en G2.....	54
4.1 Análisis de la proliferación de epimastigotas.....	54
4.2 Ensayos de infección in vitro.....	55
Discusión.....	59
Disrupción génica de los grupos G6 y G9 de GP63.....	59
Sustitución dirigida del grupo G2 de GP63.....	60
Impacto de la delección de G2 sobre la biología del parásito.....	61
Limitaciones del estudio y perspectivas.....	63
Conclusiones.....	66
Bibliografía.....	67

Listado de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la generación del ADN codificante para los sgRNAs

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la generación del ADN donador

Tabla 3. Cebadores utilizados para evaluar la edición por PCR

Tabla 4. Cebadores utilizados para la RT-qPCR

Tabla 5. Características de los ARN guías elegidos para la edición de G2

Tabla 6. Concentración y pureza del ADN genómico extraído

Tabla 7. Concentración y pureza del ARN total extraído

Listado de figuras

Figura 1. Distribución de las especies de triatomíneos de mayor importancia epidemiológica.

Figura 2. Principales formas celulares de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 4. Diagrama de la superficie de *T. cruzi*.

Figura 5. Modelos de invasión de *Trypanosoma cruzi* a la célula hospedera.

Figura 6. Representación estructural y superficial de GP63 de *L. major*.

Figura 7. Modulación de la señalización y respuesta inmune innata del macrófago por GP63 de *Leishmania*.

Figura 8. Representación esquemática de los 11 grupos de GP63.

Figura 9. Etapas del sistema de inmunidad CRISPR-Cas.

Figura 10. Representación del sistema CRISPR-Cas9 tipo II.

Figura 11. Generación de los ADN donador y construcción de los sgRNAs.

Figura 12. Expresión de miembros de GP63 en los principales estadios de *T. cruzi*.

Figura 13. Alineamiento de secuencias nucleotídicas del G2 de GP63 de *T. cruzi*.

Figura 14. Esquema de los ADN donador diseñados para las dos estrategias de edición.

- Figura 15.** Análisis por electroforesis en gel de los productos de PCR purificados.
- Figura 16.** Diagrama del procedimiento de edición de epimastigotas mediante CRISPR-Cas9.
- Figura 17.** Diseño de cebadores para la verificación de la edición génica.
- Figura 18.** Evaluación por PCR y análisis por electroforesis en gel de agarosa de la interrupción de G6 y G9.
- Figura 19.** Evaluación por PCR y análisis por electroforesis en gel de agarosa de la sustitución de G2.
- Figura 20.** Evaluación por PCR de clones obtenidos a partir de la línea editada G2.
- Figura 21.** Expresión relativa de G2 mediante RT-qPCR.
- Figura 22.** Curvas de amplificación y disociación de TIM y G2.
- Figura 23.** Curva de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c).
- Figura 24.** Micrografía de inmunofluorescencia indirecta de células Vero a 48 horas post-infección
- Figura 25.** Ensayos de infección *in vitro* a 48 horas post-infección.
- Figura 26.** Cuantificación de tripomastigotas liberados en el sobrenadante de cultivos infectados.

Introducción

1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una zoonosis causada por el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi*, identificado hace más de un siglo como su agente etiológico (Chagas, 1909). Esta patología es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida (WHO, 2025), que se calcula es responsable de más de 10.000 muertes anuales, con más de siete millones de personas infectadas con *T. cruzi* a nivel mundial (WHO, 2025).

Si bien como resultado de diversas estrategias de control epidemiológico la incidencia de la enfermedad ha disminuido a lo largo de los años, constituye aún hoy una importante carga socioeconómica para varios países de América Latina (Moncayo & Silveira, 2017). Desde el punto de vista clínico, la enfermedad suele iniciar con una fase aguda de baja mortalidad y síntomas poco específicos (Herrerros-Cabello et al., 2020). Posteriormente puede transicionar a una etapa crónica asintomática o sintomática con trastornos cardíacos graves, megavisceras o ambas (Rassi et al., 2012).

Una de las principales dificultades en el manejo de la enfermedad radica en la gran diversidad genética del parásito *T. cruzi*, que resulta en una enorme heterogeneidad biológica entre múltiples cepas que circulan simultáneamente (Zingales et al., 2012). Esta variabilidad genética se ha asociado directamente con las diferencias en las manifestaciones clínicas, así como en las tasas de morbilidad y mortalidad observadas en distintas áreas geográficas (Manoel-Caetano & Silva, 2007).

1.1. Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas presenta dos etapas características: una fase aguda de corta duración, que corresponde al inicio de la infección, y una fase crónica que puede persistir durante toda la vida del hospedero. La fase aguda tiene una duración aproximada de seis semanas y suele presentarse de manera asintomática o con síntomas como fiebre, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia y edema en el sitio de entrada del parásito, conocido como chagoma (Laranja et al., 1956). En el 10% de los casos, la fase aguda puede generar un cuadro grave con miocarditis, derrame pericárdico o meningoencefalitis (Dias, 1995). La mortalidad de la fase aguda oscila entre menos del 2% en casos de transmisión horizontal o congénita y hasta el 35% en casos de transmisión oral. Además, dado que *T. cruzi* puede comportarse como un parásito oportunista, en pacientes inmunosuprimidos puede darse una reactivación con un riesgo de mortalidad del 20% (Pérez-Molina et al., 2018). En la mayoría

de los pacientes, la fase aguda se resuelve espontáneamente y da lugar a una etapa crónica indeterminada, caracterizada por la ausencia de síntomas durante años o décadas.

Sin embargo, el 40% de los individuos infectados desarrollan compromiso orgánico crónico aproximadamente 20 años después de la infección inicial (Espinosa et al., 1985). Las manifestaciones clínicas en esta etapa dependen de los tejidos afectados por la persistencia del parásito. El compromiso cardíaco es la forma más frecuente y grave de la enfermedad crónica, y afecta principalmente al sistema de conducción y al miocardio, desarrollando la denominada cardiopatía chagásica (Rassi et al., 2012). Las principales causas de muerte en estos pacientes son insuficiencia cardíaca avanzada, tromboembolismo y muerte súbita (Rassi Jr et al., 2001). Por su parte, la forma digestiva de la enfermedad incluye desde trastornos digestivos y gastrointestinales, hasta manifestaciones severas como el desarrollo de un megacolon o un megaesófago, aumentando el riesgo de desarrollar cáncer esofágico (de Oliveira & Meneghelli, 1998).

A pesar de que la enfermedad puede curarse por completo si se diagnostica y trata en la fase aguda, la detección temprana sigue siendo un desafío importante. Se estima que menos del 10% de las personas con Chagas han sido diagnosticadas, y apenas el 1% de los infectados accede a tratamiento cada año. Esto se debe, en gran parte, a la naturaleza asintomática o inespecífica de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, lo que contribuye a la subestimación de la carga real de la enfermedad en las poblaciones afectadas (OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud, 2023).

1.2. Patogénesis

La patogénesis de la enfermedad de Chagas está profundamente vinculada a la interacción entre el parásito *Trypanosoma cruzi* y el sistema inmune del hospedero, ya que tanto la virulencia de la cepa como la respuesta del hospedero determinan el curso de la enfermedad (Z. A. Andrade, 1999). Durante la fase aguda, el daño tisular proviene principalmente de la replicación intracelular del parásito, que provoca la lisis celular.

Por su parte, la fase crónica, se caracteriza por la persistencia del parásito en los tejidos, conduciendo a una respuesta inflamatoria sostenida que se convierte en el principal mecanismo de daño tisular. Debido al desequilibrio observado entre la actividad inflamatoria y la regulación inmune, se ha propuesto que la enfermedad de Chagas podría además involucrar mecanismos autoinmunes, posiblemente mediados por reactividad cruzada entre antígenos parasitarios y componentes del propio hospedero (L. O. Andrade & Andrews, 2005).

Por otro lado, para favorecer el establecimiento de la infección, *T. cruzi* ha desarrollado diversos mecanismos de evasión inmunológica, entre los que se destaca la expresión de una

gran diversidad de antígenos en su superficie, dificultando la detección y eliminación por parte del sistema inmune del hospedero. En este contexto, familias multigénicas como las mucinas, las trans-sialidasas, proteínas asociadas a mucinas (MASP) y GP63, se han propuesto como mediadores clave en la interacción con el hospedero (De Pablos & Osuna, 2012).

1.3. Tratamiento

El tratamiento disponible para la enfermedad de Chagas se basa en la administración de dos fármacos antiparasitarios: benznidazol y nifurtimox. Ambos fueron desarrollados hace más de seis décadas y, si bien continúan siendo las únicas opciones terapéuticas aprobadas, presentan limitaciones importantes tanto en su eficacia como en su perfil de seguridad (Bermudez et al., 2016). El tratamiento con nifurtimox es interrumpido en hasta el 75% de los casos debido a la intolerancia de los efectos adversos, que se presentan con una frecuencia de hasta el 97.5%. Los efectos secundarios más usuales son trastornos digestivos, anorexia y trastornos neurológicos como insomnio, alteraciones del estado de ánimo, parestesias y neuropatía periférica (Coura & Castro, 2002; Y. Jackson et al., 2010). Si bien el benznidazol tiene un mejor perfil de tolerabilidad, también presenta una toxicidad considerable. En este caso, los efectos secundarios oscilan entre erupciones cutáneas, intolerancia digestiva, astenia, cefalea y trastornos del sueño (Molina et al., 2015; Pinazo et al., 2010).

Estos fármacos muestran una mayor efectividad cuando se administran en la fase aguda y en casos de reactivación, así como en el primer año de vida de pacientes con enfermedad congénita. Sin embargo, las tasas de curación descienden significativamente en adultos en la fase crónica de la enfermedad (Coura & Castro, 2002). Estas limitaciones evidencian la necesidad de desarrollar tratamientos más eficaces, accesibles y seguros contra la enfermedad de Chagas. Por lo tanto, es de gran interés avanzar en la identificación y caracterización de nuevos blancos moleculares en el parásito.

1.4. Transmisión

En regiones endémicas, la principal vía de transmisión de *Trypanosoma cruzi* es la vectorial, mediante insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, comúnmente conocidos como vinchucas. Los triatominos se infectan al alimentarse de sangre con parásitos circulantes, y transmiten el parásito al defecar cerca de la picadura, permitiendo su ingreso por la piel lesionada o mucosas (Rassi et al., 2012). Dentro de las numerosas especies de triatominos, cerca de veinte son responsables de la transmisión del Chagas a humanos, debido a su capacidad de infestar y colonizar áreas habitadas por humanos (Gourbière et al., 2012) (**Figura 1**). Estos insectos pertenecen a diversos géneros, entre los que destacan *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*. Entre las especies más relevantes desde el punto de vista

epidemiológico se encuentran *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Zeledon & Rabinovich, 1981).

El ciclo de transmisión de *T. cruzi* puede dividirse en tres ámbitos ecológicos interconectados: doméstico, peridoméstico y selvático. En el ciclo doméstico, los triatomíneos habitan en el interior o en contacto estrecho con las viviendas humanas, tradicionalmente casas de barro, alimentándose de la sangre de humanos y animales domésticos. En el ciclo peridoméstico, los vectores se localizan en áreas periféricas, en estructuras cercanas a las viviendas como gallineros o corrales, donde se alimentan principalmente de animales domésticos y silvestres. Finalmente, el ciclo selvático involucra la transmisión a animales silvestres en su entorno natural, aunque ocasionalmente puede afectar a humanos, sobre todo en zonas con deforestación o expansión humana hacia hábitats naturales (Aguilar et al., 2007). En conjunto, el parásito ha sido detectado en más de 150 especies de vertebrados, principalmente mamíferos.

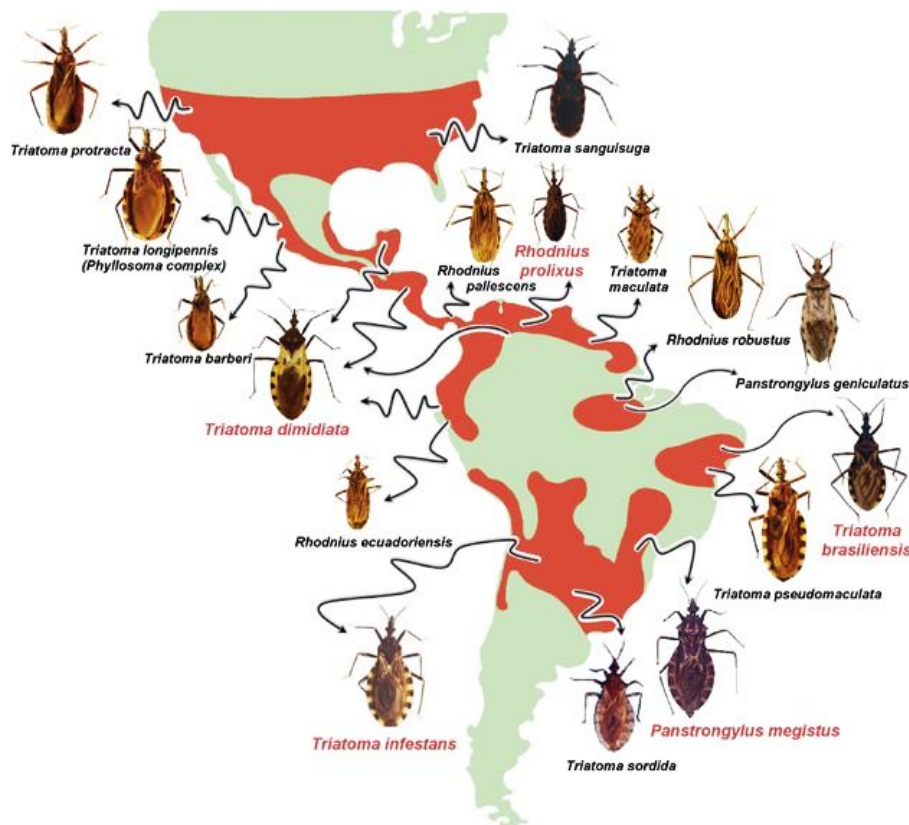


Figura 1. Distribución de las especies de triatomíneos de mayor importancia epidemiológica. Las áreas sombreadas en rojo indican su distribución geográfica aproximada. Los nombres en rojo corresponden a las especies consideradas principales vectores de *Trypanosoma cruzi*. Imagen extraída de Gourbière et al., 2012.

Si bien la vía vectorial representa la forma clásica de transmisión, *T. cruzi* también puede transmitirse por vías no vectoriales, como la transmisión congénita (de madre a hijo durante la gestación), la transfusión de sangre o el trasplante de órganos provenientes de donantes

infectados, o la transmisión oral, relacionada al consumo de alimentos o bebidas contaminadas con heces de triatominos infectados. La transmisión oral, aunque menos frecuente, puede provocar formas agudas graves de la enfermedad, con mayor riesgo de complicaciones y mortalidad.

1.5. Epidemiología

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, cerca de 100 millones de personas en el mundo se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas (WHO, 2025). Tradicionalmente la enfermedad de Chagas ha estado vinculada a regiones rurales, afectando principalmente a poblaciones en situación de pobreza y con acceso limitado a los servicios de salud. Aunque ha sido clasificada como una enfermedad tropical desatendida, algunos autores argumentan que no es la patología en sí la que ha sido relegada, sino las poblaciones que la padecen o están en riesgo de contraerla (Briceño-León & Méndez Galván, 2007).

En países como Uruguay, Chile y algunas regiones de Brasil, la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas ha sido interrumpida gracias a programas de control del principal vector domiciliario, *Triatoma infestans*. Estas iniciativas incluyeron el mejoramiento de las viviendas rurales (Salvatella et al., 2014) como el impulsado por el Movimiento de Erradicación de la Vivienda Insalubre Rural (Mevir) en Uruguay. A pesar de esto, la presencia de otras especies de triatominos en el peridomicilio representa una amenaza constante para la reemergencia de la enfermedad (Briceño-León & Méndez Galván, 2007).

En América Latina, la implementación de pruebas serológicas obligatorias en bancos de sangre ha reducido significativamente los casos de transmisión transfusional de *T. cruzi*. Como consecuencia, en Uruguay, la principal forma de transmisión es la vía congénita, con una incidencia cercana al 4% (Amorín & Pérez, 2016; Salvatella, 2016). Por este motivo, en nuestro país se realiza serología para Chagas en mujeres embarazadas, y un seguimiento hasta el año de vida a los bebés nacidos de madres positivas, para en caso de confirmarse la infección iniciar el tratamiento farmacológico de manera oportuna (Pirez et al., 2017).

A pesar de estos avances, han aparecido nuevos desafíos como resultado de transformaciones demográficas y ambientales que alteran la dinámica epidemiológica del Chagas en distintas regiones (Briceño-León, 2009). Actividades como la expansión agropecuaria y la explotación maderera en zonas como la Amazonia han resultado en la aparición de nuevas comunidades rurales expuestas al riesgo de infección por *T. cruzi*. Estas actividades suelen ir acompañadas de deforestación masiva de zonas boscosas, lo que altera los ecosistemas locales, reduce las fuentes de alimento silvestre de los vectores y puede incentivar su desplazamiento hacia zonas habitadas por humanos, incluso ciudades (Aguilar et al., 2007; Carrasco et al., 2005).

Además, se han documentado brotes de transmisión oral de *T. cruzi*, asociados al consumo de jugos contaminados durante su procesamiento con vectores infectados (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012). Este fenómeno, junto con el desplazamiento documentado de vectores hacia áreas urbanizadas, y la presencia de casos urbanos (derivados de transmisión congénita o migraciones desde zonas endémicas), configura un escenario en el que parásito y vector podrían coexistir en las ciudades, incrementando el riesgo de nuevos casos.

A lo largo de las últimas décadas, la enfermedad de Chagas ha dejado de ser un problema exclusivamente latinoamericano y rural. El aumento de los movimientos migratorios desde zonas endémicas, así como el turismo internacional, han facilitado su dispersión global. En palabras de Briceño-León (2009), “era una enfermedad latinoamericana, pero ya dejó de serlo”, haciendo referencia al cambio en su distribución geográfica y a su reconocimiento como una problemática mundial.

A casi 120 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas, han habido grandes avances en el control de la enfermedad. Sin embargo, los nuevos casos y desafíos nos indican la importancia de mantener los programas de control vectorial y de vigilancia epidemiológica. Asimismo, debemos enfocarnos en mejorar la calidad de vida y el acceso a la salud de las poblaciones en riesgo, así como desarrollar nuevos tratamientos mejor tolerados y efectivos, para asegurarnos que la enfermedad de Chagas deje de ser considerada una enfermedad desatendida (Pérez-Molina et al., 2018).

2. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo eucariota flagelado unicelular perteneciente a la clase Kinetoplastea, familia Trypanosomatidae. Esta familia está compuesta exclusivamente por parásitos obligados, con la mayoría de sus miembros siendo parásitos monoxenos, es decir, organismos que completan su ciclo vital en un único hospedero, en este caso típicamente insectos (Lukeš et al., 2018). Desde estas formas ancestrales monoxenas, el parasitismo dixeno (la capacidad de alternar entre dos hospederos) evolucionó de manera independiente en varias ocasiones, dando origen a géneros capaces de infectar vertebrados, como *Leishmania* y *Trypanosoma* (Lukeš et al., 2018). Estos linajes incluyen a los agentes etiológicos de importantes enfermedades humanas como las leishmaniasis, la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas.

2.1. Ciclo de vida

El parásito *Trypanosoma cruzi* posee un ciclo de vida complejo que involucra distintos estadios morfológicos y funcionales, adaptados a los ambientes del vector triatomino y del hospedero vertebrado mamífero (**Figura 2**). Por un lado encontramos a las dos formas

replicativas, que multiplican por fisión binaria longitudinal y presentan el kinetoplasto (una estructura especializada conteniendo el ADN mitocondrial) en posición anterior: los epimastigotas son alargados y flagelados, con una membrana ondulante poco desarrollada; mientras que la forma intracelular amastigota es redondeada y con un corto flagelo. Por otro lado, los tripomastigotas metacíclicos y sanguíneos, son formas alargadas y flageladas muy móviles, cuyo kinetoplasto está en posición posterior con respecto al núcleo y presentan una membrana ondulante desarrollada (Peña-Callejas et al., 2022).

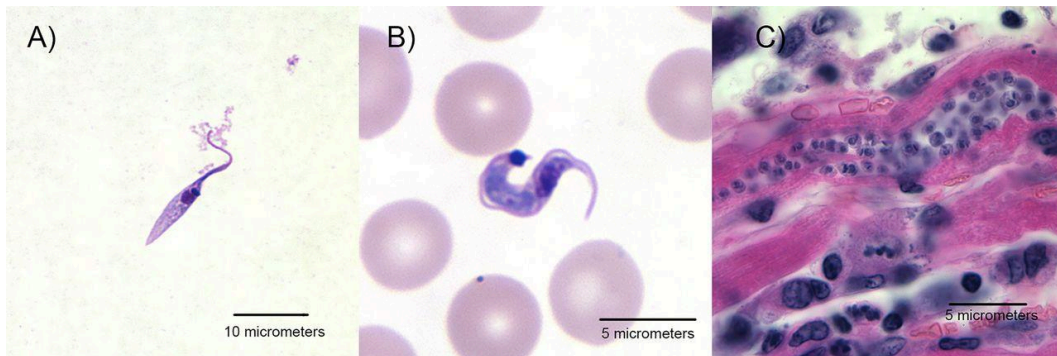


Figura 2. Principales formas celulares de *Trypanosoma cruzi*. (A) Epimastigota en cultivo (tinción de Giemsa). (B) Tripomastigota en frotis de sangre periférica durante la fase aguda (tinción de Giemsa). (C) Amastigotas en un miocito cardíaco en fase crónica (hematoxilina-eosina). Imágenes adaptadas de los CDC. (Extraído de Bern et al., 2019).

Los estadios mencionados corresponden a las formas morfológicas clásicas del parásito, sin embargo cabe destacar que existen numerosas formas intermedias, observadas ya por Chagas en 1909 (Chagas, 1909; De Souza & Barrias, 2020). Recientemente, gracias a metodologías de alta resolución como la microscopía de expansión ultraestructural, se han podido no solo identificar varias de estas formas intermedias, sino también reconstruir el proceso de transición entre las mismas mediante inmunofluorescencia indirecta (Tomasina et al., 2024).

El ciclo comienza cuando el insecto vector ingiere sangre de un hospedero vertebrado que contiene tripomastigotas circulantes. Estas formas no replicativas alcanzan el intestino medio del triatomino, donde se transforman en epimastigotas, la forma replicativa del parásito en el insecto vector. Los epimastigotas se multiplican y migran hacia el intestino posterior, donde se diferencian en tripomastigotas metacíclicos, la forma infectiva para el hospedero vertebrado (Tyler et al., 2003). Estos últimos son excretados junto con las heces del insecto y pueden ingresar a un nuevo hospedero a través de mucosas o pequeñas lesiones en la piel, típicamente producidas por la propia picadura del vector (Rassi et al., 2012).

Una vez en el hospedero mamífero, los tripomastigotas metacíclicos invaden células nucleadas en el sitio de inoculación, o son endocitados por fagocitos profesionales como macrófagos o células dendríticas (Van Overtvelt et al., 1999). Tras escapar al citoplasma, se diferencian en las formas intracelulares amastigotas, que proliferan activamente y luego se

diferencian en tripomastigotas sanguíneos, que son liberados al causar la lisis de la célula hospedera. Los parásitos liberados pueden infectar células vecinas o circular por el torrente sanguíneo y diseminarse hacia otros tejidos (**Figura 3**) (Tyler et al., 2003). La parasitemia se reduce a medida que se activa la respuesta inmune del hospedero, aunque *T. cruzi* puede persistir en forma latente en tejidos específicos, como el músculo cardíaco o el sistema nervioso entérico (Z. A. Andrade, 1999; de Oliveira, 1998).

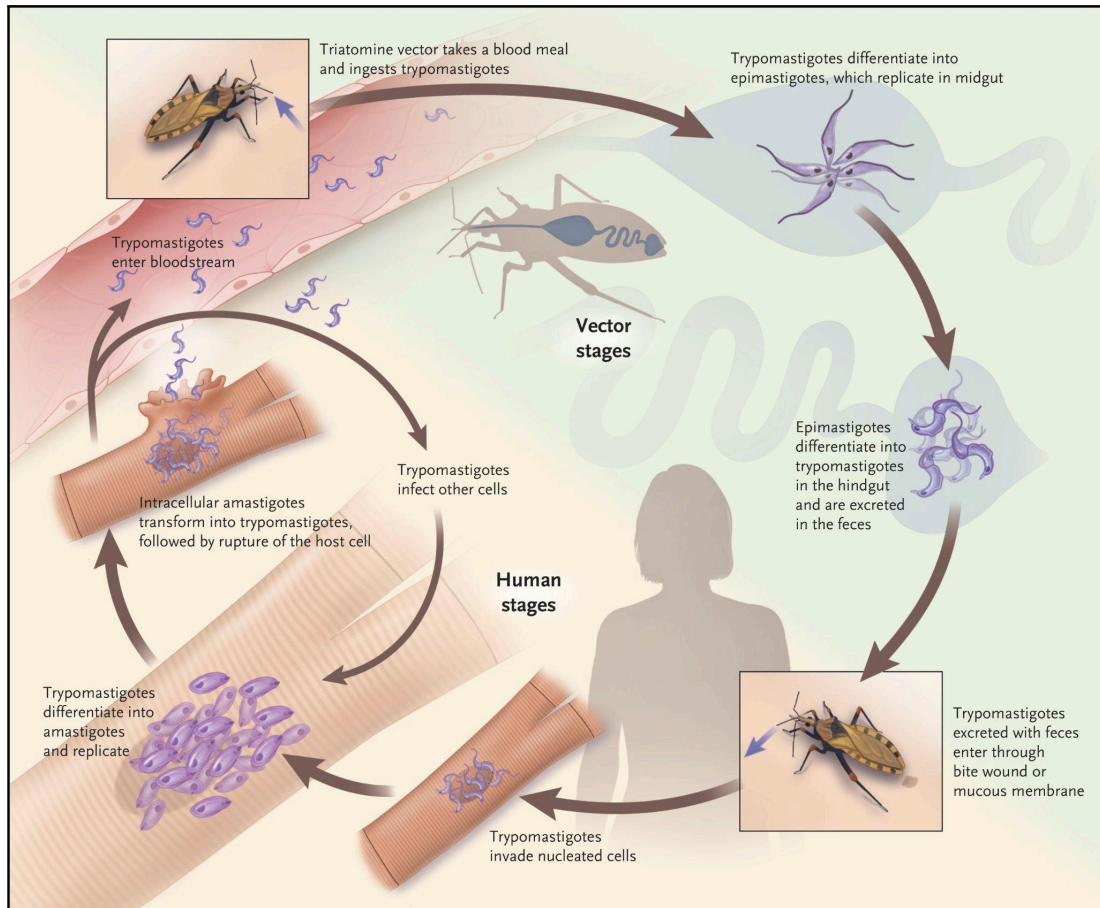


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. El triatominio ingiere tripomastigotas presentes en la sangre de un hospedero infectado, los cuales se transforman en epimastigotas y se multiplican en su intestino medio. Luego migran al intestino posterior y se diferencian en tripomastigotas metacíclicas infectivas, que son eliminados con las heces. Al ingresar al hospedero, invaden células, se convierten en amastigotas replicativas y, tras varios días, vuelven a diferenciarse en tripomastigotas, causando la lisis celular y liberándose para reiniciar el ciclo. Extraído de Bern, 2011.

Durante su ciclo de vida, el parásito enfrenta condiciones ambientales sumamente variables, incluyendo cambios en disponibilidad de nutrientes, temperatura, presión osmótica y concentración de oxígeno. Para adaptarse expresa proteínas especializadas en cada etapa, como transportadores de aminoácidos, glicoproteínas de superficie y enzimas específicas (Berná et al., 2017). Esta plasticidad biológica implica la necesidad de una regulación precisa de la expresión génica, la cual se da principalmente a nivel post-transcripcional, ya que los tripanosomátidos carecen de promotores convencionales (Palenchar & Bellofatto, 2006;

Thomas et al., 2009). Esta regulación sucede de forma coordinada mediante varios mecanismos, como cambios en la estabilidad del ARN mensajero y su reconocimiento por factores específicos, cambios en la localización subcelular y en la eficiencia de traducción, así como modificaciones epigenéticas, entre otros (Chávez et al., 2017; Díaz-Viraqué et al., 2023; Pastro et al., 2017; Smircich et al., 2015).

2.2 Mecanismos de invasión

La invasión de las células hospederas por *Trypanosoma cruzi* es un proceso complejo que involucra adhesión, transducción de señales e internalización (De Souza et al., 2010). La adhesión depende del reconocimiento específico entre moléculas de superficie del parásito y moléculas del hospedero (incluyendo glicoconjugados con ácido siálico y glicosaminoglicanos como heparina y heparán sulfato) (**Figura 4**).

Una adhesión exitosa no solo depende de la disponibilidad de moléculas de superficie específicas, sino que también implica procesos dependientes de ATP, asociados a una redistribución de ligandos parasitarios y a la secreción activa de factores proteicos involucrados en la invasión (Burleigh & Andrews, 1995). Gran parte de las moléculas parasitarias involucradas en la invasión, corresponden a glicoproteínas estadio-específicas, pertenecientes a familias multigénicas (Burleigh & Andrews, 1995).

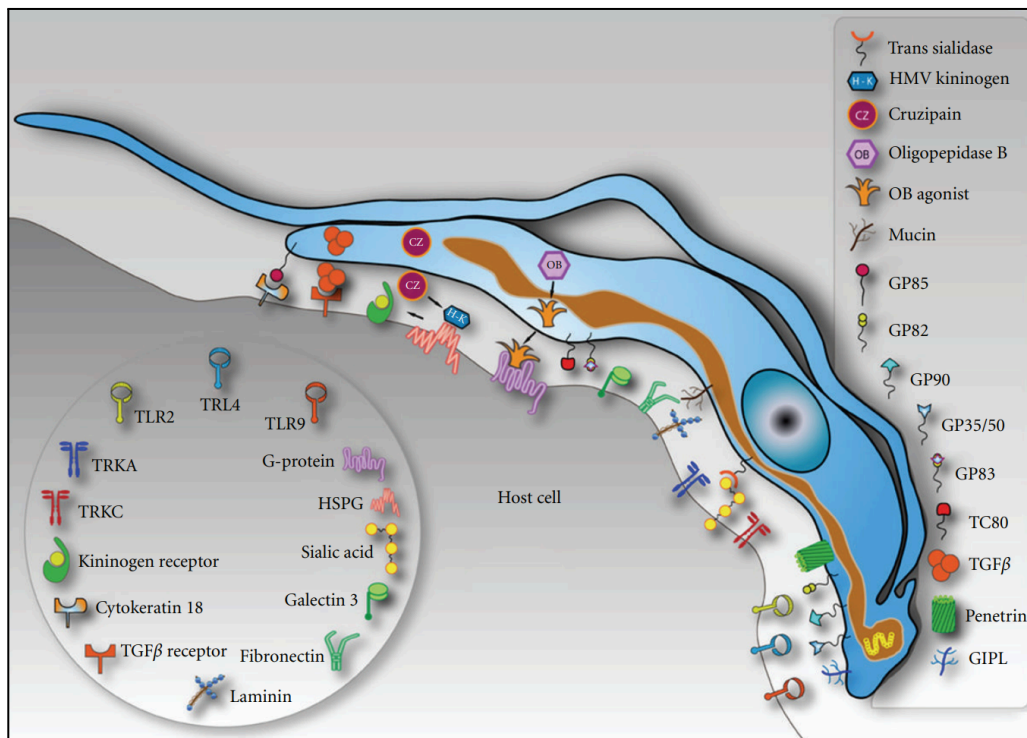


Figura 4. Diagrama de la superficie de *T. cruzi*. Se muestran algunas de las moléculas involucradas en la interacción entre el parásito y la célula hospedera. Ilustración extraída de De Souza et al., 2010.

Tras la adhesión, se desencadena una transducción de señales que genera un aumento transitorio de los niveles de calcio citosólico tanto en el parásito como en la célula hospedera, favoreciendo la invasión. Esta señalización es inducida por factores que interactúan con la célula hospedera, producidos por los tripomastigotas infectivos (Burleigh & Andrews, 1995; De Souza et al., 2010).

Trypanosoma cruzi posee la capacidad de infectar una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo tanto células fagocíticas como no fagocíticas. En células fagocíticas la internalización puede ocurrir tanto por endocitosis como por fagocitosis. En cambio, su entrada en células no fagocíticas se basa en mecanismos alternativos como la fusión dirigida de lisosomas del hospedero con la membrana plasmática en el sitio de invasión (L. O. Andrade & Andrews, 2005) (Figura 5).

Independientemente del mecanismo de ingreso, los tripomastigotas quedan confinados en una vacuola parasitófora que es posteriormente fragmentada (por la formación de poros y la acción de enzimas parasitarias secretadas) permitiendo la liberación de los amastigotas al citoplasma, donde inician su replicación (De Souza et al., 2010).

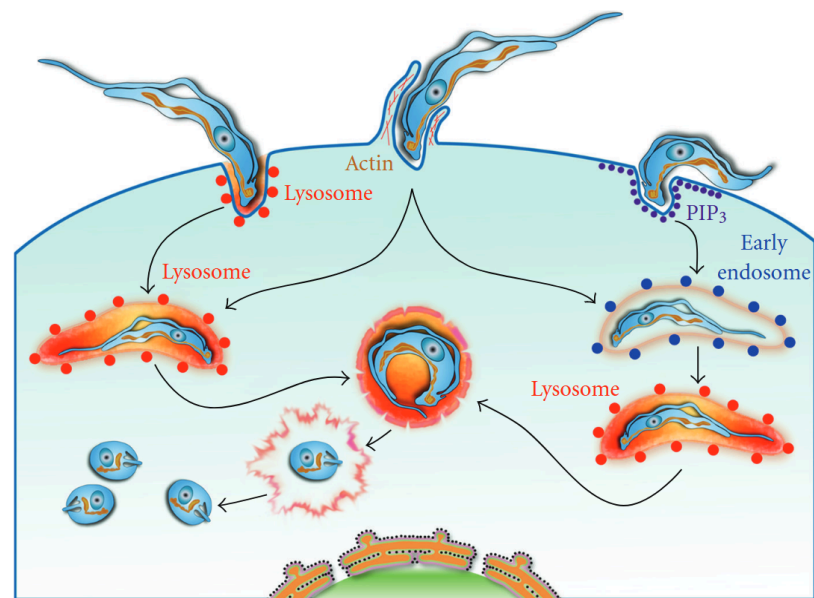


Figura 5. Modelos de invasión de *Trypanosoma cruzi* a la célula hospedera. Se ilustran las tres vías principales: dependiente de lisosomas, mediada por exocitosis regulada por Ca^{2+} ; dependiente de actina, con formación de una vacuola parasitófora por remodelación de la membrana plasmática; e independiente de lisosomas, mediante invaginaciones de la membrana plasmática y maduración progresiva de la vacuola. En todos los casos, los tripomastigotas se transforman en amastigotas y se produce la lisis de la vacuola, liberando los amastigotas al citoplasma, donde inician su replicación. Ilustración extraída de De Souza et al., 2010.

A pesar de los avances en el entendimiento de la biología de *T. cruzi*, persisten múltiples interrogantes respecto a su ciclo de vida, su interacción molecular con el hospedero y su dinámica durante la infección. En particular, aún se conoce poco sobre los mecanismos que

regulan la diferenciación del parásito en el hospedero mamífero y en el insecto vector, así como las señales que desencadenan la ruptura de la célula hospedera y el egreso del parásito.

2.3. Genoma y familias multigénicas

Los tripanosomátidos patógenos humanos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*, han seguido trayectorias evolutivas divergentes, adaptando sus ciclos de vida, estructuras moleculares y estrategias de infección a los entornos ecológicos y biológicos específicos de sus respectivos hospederos. En el año 2005 se publicaron las secuencias genómicas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, lo cual representó un hito en el estudio de los tripanosomátidos (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Ivens et al., 2005). A partir de entonces, con la secuenciación de numerosas cepas se ha incrementado significativamente el conocimiento sobre la arquitectura y el contenido de sus genomas.

Actualmente se encuentran disponibles en las bases de datos varios genomas de *T. cruzi*, lo que ha permitido evidenciar una enorme variabilidad genética entre las distintas cepas (Herrerros-Cabello et al., 2020). Algunas cepas como Berenice, TCC y Dm28c han sido secuenciadas mediante un enfoque que combina tecnologías de secuenciación de lectura corta y de tercera generación (Berná et al., 2018; Díaz-Viraqué et al., 2019). Esta estrategia ha permitido obtener ensamblajes de mayor calidad, facilitando el análisis de regiones complejas y repetitivas del genoma (Greif et al., 2025).

La organización genómica de *T. cruzi* incluye genes de copia única altamente conservados, familias multigénicas, regiones no codificantes y secuencias repetitivas (Berná et al., 2018; El-Sayed et al., 2005). Presenta una estructura bipartita, en la cual los genes se distribuyen entre un compartimento *core*, donde se encuentran los genes conservados en tripanosomátidos, y un compartimento disruptivo, caracterizado por la presencia de genes que evolucionan constantemente, como los pertenecientes a las familias multigénicas características de este parásito (Berná et al., 2018).

Aunque se clasifica como un organismo diploide, se ha observado la presencia de aneuploidías y variaciones en la longitud cromosómica incluso entre clones de una misma cepa. Esta variabilidad se ve potenciada por la abundancia de secuencias repetitivas y regiones con alta frecuencia de recombinación, generando una gran diversidad genómica (Reis-Cunha et al., 2015). Esta plasticidad genómica ha favorecido la expansión y diversificación de las familias multigénicas, aumentando la capacidad de adaptación del parásito y su persistencia en el hospedero. Como resultado, se observa una notable heterogeneidad patogénica entre distintas cepas de *T. cruzi* (Pech-Canul et al., 2017).

La mayoría de estas familias codifican para proteínas de superficie que desempeñan funciones clave en los estadios infectivos, particularmente en los procesos de adhesión,

invasión y evasión del sistema inmune (De Pablos & Osuna, 2012). Entre las principales familias multigénicas se encuentran las mucinas, las trans-sialidasas, las MASP, las GP63, las DGF1, y otras familias que no corresponden a proteínas de superficie como las RHS, todas ellas con funciones relevantes en la interacción parásito-hospedero. Las mucinas y las trans-sialidasas han sido ampliamente estudiadas, evidenciándose su participación en la entrada del parásito a las células hospederas y en la evasión de la respuesta inmune (Buscaglia et al., 2006; Freire-de-Lima et al., 2015). Sin embargo, las funciones de otras familias como MASP y GP63 aún no han sido completamente caracterizadas (Berná et al., 2017; Leão et al., 2022).

El análisis del perfil de expresión de la familia GP63 sugiere que estas proteínas desempeñan funciones clave durante los estadios del parásito que ocurren en el hospedero mamífero. Berná et al. (2025) reportaron que los niveles de expresión de esta familia multigénica varían a lo largo del ciclo de vida, identificando varios miembros que presentan una expresión alta y diferencial en el estadio tripomastigota. A su vez, la identificación de tres grupos de secuencias 3' UTR, asociados a genes sobreexpresados en tripomastigotas, en amastigotas o de baja expresión, respaldan la existencia de un mecanismo de regulación postranscripcional dependiente del estadio (Berná et al., 2017).

2.4. Familia GP63

La familia génica GP63, inicialmente descrita como un antígeno de superficie en *Leishmania* (Russell & Wilhelm, 1986), codifica para metaloproteasas dependientes de zinc, denominadas leishmanolisinas. Estas enzimas poseen un amplio rango de sustratos y representan uno de los principales factores de virulencia de *Leishmania* (Olivier et al., 2012).

La obtención de la estructura cristalina de GP63 en *Leishmania*, permitió identificar tres dominios con características distintas (**Figura 6**). El dominio N-terminal contiene el motivo catalítico (HEXXH) y aloja el ion zinc, y conforma, junto al dominio central, el sitio activo de la enzima. El dominio C-terminal, compuesto principalmente por hojas β y estabilizado por múltiples puentes disulfuro, presenta regiones con alta variabilidad de secuencia y está conectado al anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol) (Schlagenhauf et al., 1998).

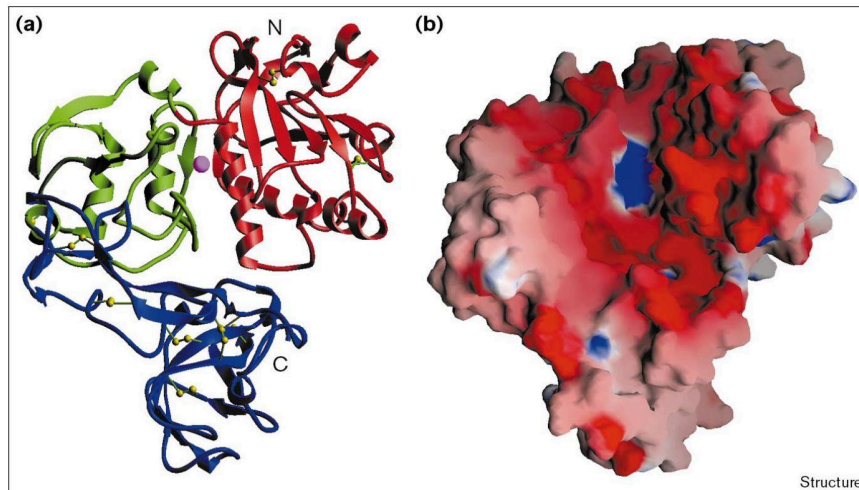


Figura 6. Representación estructural y superficial de GP63 de *L. major*. (A) Modelo de cinta que muestra la organización tridimensional en tres dominios: N-terminal (rojo), central (verde) y C-terminal (azul). El sitio activo, típico de metaloproteinasas tipo metzincina, contiene un átomo de zinc (esfera magenta) coordinado por tres histidinas conservadas. Los enlaces disulfuro se indican en amarillo. (B) Vista de superficie coloreada según el potencial electrostático: cargas negativas en rojo y positivas en azul, destacando una región aniónica en torno al sitio catalítico. Extraído de Schlagenhauf et al., 1998.

GP63 es la proteína más abundante en la superficie de *Leishmania* (Yao, 2010) y cumple múltiples funciones biológicas relevantes para la infección y supervivencia del parásito en el hospedero. Además de su expresión en la superficie, algunos miembros de esta familia son secretados o presentan localización intracelular (Yao, 2010). Estudios han demostrado que participa en la evasión del sistema inmunológico, la remodelación de la matriz extracelular y la modulación de vías de señalización intracelular del hospedero (Olivier et al., 2012). A su vez, la actividad de GP63 promueve la resistencia de los parásitos extracelulares frente a la lisis mediada por el complemento y facilita su internalización por fagocitos (Isnard et al., 2012).

En células infectadas por *Leishmania*, esta proteasa puede ingresar al citoplasma e incluso al núcleo, donde afecta diversos procesos celulares del hospedero. Entre sus blancos específicos se encuentran componentes clave del sistema inmunológico, como la quinasa mTOR, cuyo clivaje inhibe la iniciación de la traducción, interfiriendo con la síntesis de interferón tipo I. Otro de sus blancos es el factor de transcripción NF- κ B, cuya alteración impide su funcionamiento como factor de transcripción de genes proinflamatorios, como citoquinas y quimioquinas (Olivier et al., 2012).

Asimismo, GP63 puede activar fosfatasa tirosina del hospedero (PTP), que inactivan varias quinasas, interfiriendo con rutas clave de señalización, como las vías JAK, MAPK e IRAK-1, impactando negativamente en la activación celular y en la producción de mediadores inmunes (Olivier et al., 2012). Estas alteraciones convergen en una supresión efectiva de la respuesta

antimicrobiana del macrófago, favoreciendo la supervivencia y proliferación del parásito (Isnard et al., 2012) (**Figura 7**).

La familia GP63 está presente en los tres tripanosomátidos patógenos de humanos: *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*, y ha evolucionado de manera divergente en cada especie, probablemente moldeada por procesos de coevolución con sus hospederos (Castro Neto et al., 2019; Ma et al., 2011). Análisis filogenéticos indican que la diversificación de los genes GP63 ocurrió antes de la separación de las especies dentro del género *Trypanosoma*, y que las expansiones observadas en *Leishmania* y *T. cruzi* son independientes (A. P. Jackson et al., 2016), indicando un posible rol adaptativo de estas proteasas en la biología de dichos parásitos.

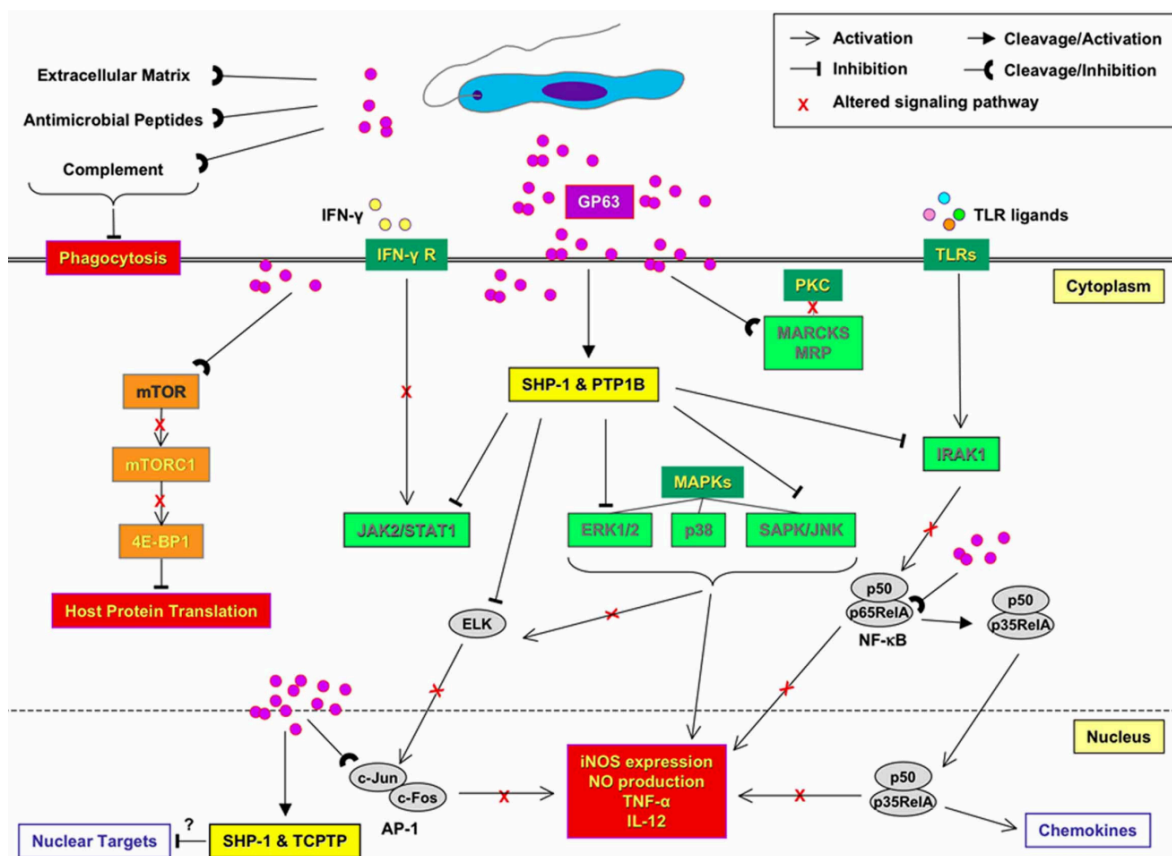


Figura 7. Modulación de la señalización y respuesta inmune innata del macrófago por GP63 de *Leishmania*. Antes de la invasión celular, GP63 protege a *Leishmania* de la lisis mediada por el complemento y promueve su internalización por los macrófagos. Una vez en el interior de la célula hospedera, GP63 activa fosfatasa tirosina específicas (como SHP-1, PTP1B y TCPTP), lo que resulta en la desregulación de vías de señalización claves, incluyendo JAK, MAPK e IRK-1. Además, esta proteasa interfiere con la síntesis proteica del hospedero al alterar la señalización dependiente de mTORC1. A nivel nuclear, GP63 puede inducir la degradación selectiva de subunidades de factores de transcripción como AP-1 y NF-κB. Ilustración extraída de Isnard et al., 2012.

El análisis del genoma de la cepa Dm28c de *T. cruzi* permitió identificar 96 genes completos y 282 pseudogenes (Berná et al., 2025) de la familia GP63. Estos genes se distribuyen tanto en el compartimento genómico conservado (*core*), como en el disruptivo. Esta organización diferencial sugiere una complejidad evolutiva y funcional de esta familia. Esta familia ha sido organizada en 11 clados definidos (algunos conformados por genes de copia única) que muestran una alta identidad intra-grupo y diferencias estructurales, funcionales y genómicas entre grupos (Berná et al., 2025).

Si bien la mayoría de estos genes poseen una señal predicha de anclaje a GPI, indicando una localización asociada a la membrana plasmática, ciertos grupos carecen de esta señal, lo cual sugiere distintas localizaciones subcelulares, y en consecuencia posibles roles especializados. Si bien se ha demostrado que ciertos miembros de esta familia presentan actividad metaloproteasa (Cuevas et al., 2003), algunos de estos genes presentan mutaciones en residuos conservados y claves del sitio catalítico (**Figura 8**) lo que podría implicar diferencias funcionales entre los miembros (Berná et al., 2025).

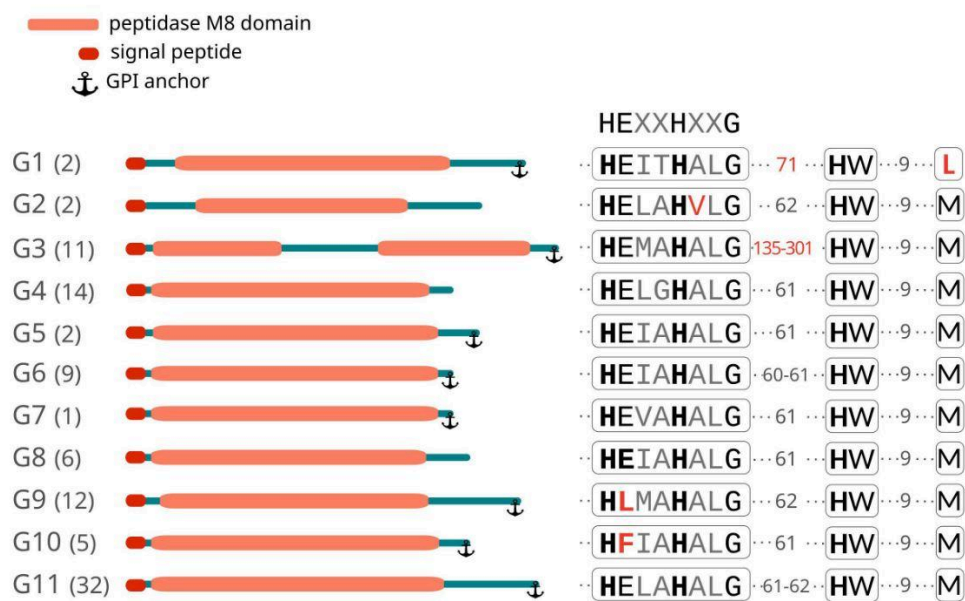


Figura 8. Representación esquemática de los 11 grupos de GP63. A la izquierda se aprecia la presencia de señal de anclaje a GPI. A la derecha se muestra el dominio catalítico HEXXHXXG, con los residuos esenciales en negrita y las variaciones específicas destacadas en rojo (Berná et al., 2025).

Análisis transcriptómicos han mostrado que esta familia presenta una expresión diferencial durante el ciclo de vida, y que algunos grupos de GP63 se sobreexpresan en tripomastigotas, la forma infectiva para el hospedero mamífero (Berná et al., 2025; Grandgenett et al., 2000). Ensayos de infección *in vitro* con tripomastigotas preincubados con anticuerpos específicos anti-GP63 muestran una disminución significativa en su capacidad infectiva en células Vero (Cuevas et al., 2003), lo que indica un rol de estas proteínas en la infección. Además, se ha reportado que la preincubación de mioblastos cardíacos con un fragmento C-terminal de

GP63 conduce a una reducción en la infección por *T. cruzi*, sugiriendo que el dominio C-terminal presenta un sitio de unión a la superficie de la célula hospedera (Kulkarni et al., 2009).

A pesar de estos hallazgos, debido a la falta de estudios específicos centrados en esta familia, se desconoce qué miembros de GP63 se expresan efectivamente a nivel proteico y cuáles son sus funciones en los diferentes estadios. Actualmente, las peptidasas de *T. cruzi*, dentro de las que se encuentran la familia GP63, son consideradas blancos potenciales para quimioterapia, lo que refuerza la necesidad de profundizar en el estudio de las funciones de estas proteínas (Alvarez et al., 2012).

3. Sistema inmune CRISPR-Cas9

3.1. Origen y mecanismo

La inmunidad refiere a todas las funciones biológicas que le confieren protección a un organismo contra las propiedades disruptivas de entidades patogénicas (Agaisse, 2007). La inmunidad innata se refiere a la capacidad intrínseca de un organismo de combatir las infecciones reconociendo características comunes a las mismas, mientras que la inmunidad adaptativa presenta una mayor complejidad, confiriendo la capacidad de adquirir memoria frente a amenazas particulares (Rath et al., 2015). Aunque algunos autores han demostrado que los invertebrados también pueden generar una respuesta inmune específica, tradicionalmente el sistema inmune adaptativo ha sido atribuido exclusivamente a los vertebrados (Agaisse, 2007).

En este sentido, resultó insólito el descubrimiento de una forma de sistema inmune adaptativo en procariontes, basado en regiones del ADN denominadas “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas” (CRISPR) (Rath et al., 2015). Este mecanismo inmunológico adaptativo presente en bacterias y arqueas, les permite reconocer y eliminar material genético exógeno, viral o plasmídico, mediante una respuesta basada en memoria genética (Lander et al., 2016).

Esta defensa involucra tres etapas fundamentales (**Figura 9**), en un primer lugar sucede la adaptación, en donde la célula procarionte detecta ADN foráneo en su citosol, y es capaz de incorporar fragmentos específicos en el *locus* CRISPR de su genoma. Estos fragmentos denominados *spacers* quedan flanqueados por las secuencias repetidas que le dan el nombre al *locus*. La segunda etapa es la de expresión, en la cual sucede la traducción de unas endonucleasas “Cas” (CRISPR *associated*), así como la transcripción y el procesamiento del *locus* CRISPR dando lugar a pequeños crRNAs (ARNs CRISPR), conformados por un repetido y un *spacer*. En el sistema CRISPR-Cas de tipo II, un segundo tipo de ARN es

necesario: el tracrRNA, el cual va a asociarse a la secuencia repetida del crRNA. Este dúplex de ARN, conforma un complejo ribonucleoproteico junto a la proteína Cas. Finalmente, en la etapa de interferencia, ante un nuevo desafío con el mismo patógeno, el crRNA puede identificar por complementariedad de bases al ADN foráneo (*protospacer*), permitiendo que la endonucleasa realice una degradación del ADN blanco de forma secuencia-específica (Rath et al., 2015).

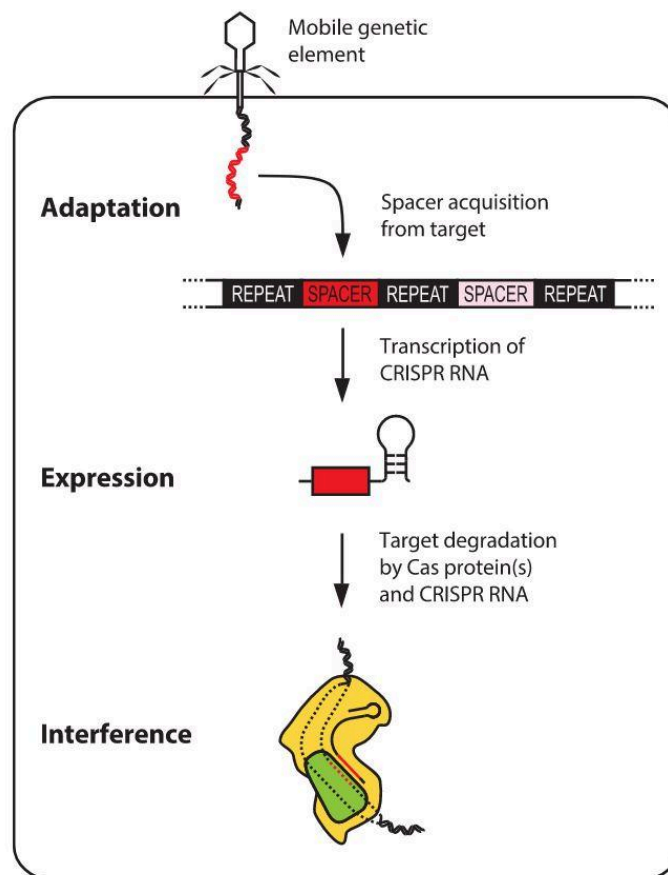


Figura 9. Etapas del sistema de inmunidad CRISPR-Cas. 1) Adaptación: incorporación de nuevos fragmentos de ADN foráneo en el locus CRISPR. 2) Expresión: transcripción del locus y maduración de los ARNs CRISPR. 3) Interferencia: reconocimiento y degradación del material genético foráneo por el complejo CRISPR-Cas (Rath et al., 2015).

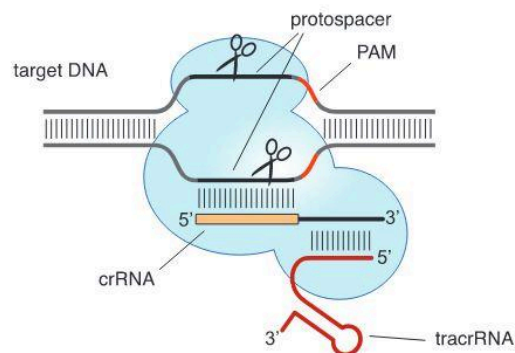
3.2. Aplicación en bioingeniería

El sistema CRISPR-Cas fue adaptado para su uso en ingeniería genética, particularmente a partir del tipo II de *Streptococcus pyogenes*, el cual se convirtió en el más empleado por su versatilidad y eficiencia. Este sistema ha revolucionado el campo de la biología molecular al permitir una edición génica precisa, eficiente y dirigida, y ha sido adaptada para su uso en una amplia variedad de organismos eucariotas y procariotas (Doudna & Charpentier, 2014). En 2020 Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier fueron galardonadas con el Premio Nobel

de Química en reconocimiento por el desarrollo de esta metodología de edición génica basada en CRISPR-Cas9.

Esta herramienta consta de una endonucleasa (Cas9) asociada a una única molécula quimera de ARN guía (sgRNA, del inglés *single guide RNA*), diseñada para dirigir la enzima hacia una secuencia de ADN específica (Jinek et al., 2012). En su aplicación para edición génica, el sgRNA es una construcción sintética que combina las funciones del crRNA y del tracrRNA (**Figura 10**). Una vez que la endonucleasa Cas9 es reclutada por el sgRNA, genera un corte de doble hebra (DSB) en la región blanco del ADN, lo cual activa los mecanismos endógenos de reparación del ADN celular, permitiendo introducir modificaciones en la secuencia genómica del organismo (Hsu et al., 2014).

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cas9 programmed by single chimeric RNA

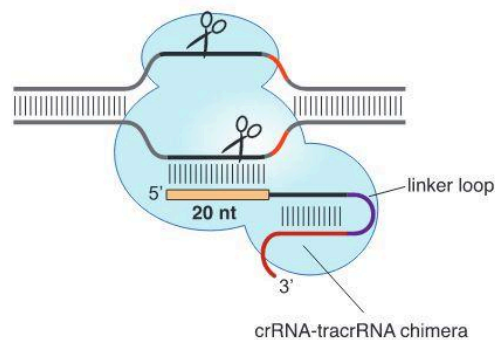


Figura 10. Representación del sistema CRISPR-Cas9 tipo II. En la parte superior, se muestra el dúplex de ARN formado por crRNA y tracrRNA, que permite el reconocimiento y corte específico del ADN blanco por Cas9. En la parte inferior, se observa una versión quimérica del ARN guía, que fusiona ambas moléculas en una sola secuencia sintética para facilitar su aplicación en edición génica Jinek et al., 2012.

Dependiendo del diseño experimental, esta rotura puede repararse por unión de extremos no homólogos (NHEJ), un proceso propenso a errores que puede inducir inserciones o deleciones (indels); o bien, mediante recombinación dirigida por homología (HDR), si se proporciona un ADN donador que actúe como molde para la reparación. Este donador debe incluir dos regiones de homología con el ADN blanco, permitiendo insertar fragmentos genéticos específicos, como genes marcadores o secuencias de interés.

El diseño del ARN guía es una etapa clave para lograr una edición específica y eficiente. Un requisito esencial para el reconocimiento por parte de la enzima Cas9 es que el sgRNA reconozca secuencias que se encuentren adyacentes a un motivo PAM (Protospacer Adjacent Motif) típicamente NGG (Hsu et al., 2014). Además de la proximidad al sitio PAM, se deben considerar parámetros como el largo de la secuencia guía, el contenido G/C y la minimización de cortes predichos fuera del blanco (*off-targets*). Para ello, existen herramientas bioinformáticas que permiten predecir regiones blanco óptimas, evaluando la eficiencia de edición, así como posibles *off-targets* mediante el análisis y comparación con bases de datos genómicas. Herramientas como EuPaGDT pensadas especialmente para parásitos, han permitido optimizar el diseño de los sgRNA, aumentando significativamente las probabilidades de éxito en los ensayos de edición (Peng & Tarleton, 2015).

A partir de estos antecedentes, utilizamos la metodología CRISPR-Cas9 para llevar a cabo la edición dirigida de genes pertenecientes a la familia multigénica GP63 de *T. cruzi*, cuya manipulación hasta hace unos años hubiera resultado extremadamente desafiante. Nos propusimos generar líneas deficientes (*knockout*) para miembros seleccionados, con el fin de evaluar su relevancia funcional durante el ciclo infeccioso de *T. cruzi*. Este estudio busca aportar evidencia sobre la participación de GP63 en la interacción hospedero-patógeno, contribuyendo a una mayor comprensión de los determinantes moleculares de la infección, así como a la identificación de posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevas estrategias contra la enfermedad de Chagas.

Hipótesis

Las proteínas GP63 de *Trypanosoma cruzi* podrían desempeñar funciones relevantes en el ciclo infectivo, por lo que esperamos que la generación de líneas *knockout* para un miembro de GP63 produzca un fenotipo menos infectivo, aportando evidencia funcional sobre su rol en la patogénesis.

Objetivos

Objetivo general

Conocer el rol funcional de la familia multigénica GP63 de *Trypanosoma cruzi* en el ciclo infectivo, mediante la generación, caracterización y análisis fenotípico de líneas de parásitos *knockout*.

Objetivos específicos

- Diseñar y generar líneas de *T. cruzi knockout* para miembros de la familia GP63, con énfasis en el grupo G2, empleando la metodología de edición genómica CRISPR-Cas9.
- Caracterizar molecularmente a las líneas generadas, confirmando la edición dirigida en los *loci* blanco y validando el *knockout* mediante cuantificación de los niveles de expresión de ARNm.
- Evaluar el impacto de GP63 en la infectividad, mediante ensayos de infección *in vitro* en células Vero con las líneas *knockout*, analizando distintos parámetros clave del proceso infectivo.

Materiales y métodos

1. Diseño del sistema CRISPR-Cas9

El diseño de los ARN guías (sgRNAs) se realizó en EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu/batch.html>), priorizando secuencias con alto puntaje de eficiencia y sin *off-targets*. Diseñamos dos sgRNAs de secuencia complementaria a cada región de interés de los genes blanco, cuya especificidad fue corroborada mediante BLAST contra el genoma completo de la cepa Dm28c de *T. cruzi*.

- Guía G2_1: TGA CTGGCACGAGTGCCCCG
- Guía G2_2: AAAGTGTCCCAGATATGAGG
- Guía G6_1: AGTCTTCACGGAGGATCTGA
- Guía G6_2: TCAGCGGTGCAGTATCTTGA
- Guía G9_1: ATCTGTGCTGCAATACATAC
- Guía G9_2: AATACATACTGGTATTATGC

El diseño de los ADN donors fue realizado manualmente y visualizado con ApE (A Plasmid Editor), para ello obtuvimos las secuencias de los genes blanco correspondientes a la región codificante y 300 pb de las regiones 5' y 3' UTR en la web de TriTryp (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/download>). Se diseñaron y construyeron ADN donors para interrumpir la expresión de los genes blanco mediante dos estrategias distintas.

Para interrumpir varios miembros de un mismo grupo, se optó por la estrategia de disrupción génica por inserción de codones de terminación (*stop*), descrita por Burle-Caldas (2022). Para ello, se empleó un ADN donor que incluye (i) brazo de homología 5' (de 25 o 30 pb) aguas abajo del codón de inicio, (ii) múltiples codones de terminación en diferentes marcos de lectura, sitios de restricción específicos (EcoRI o BamHI), una secuencia universal M13, y (iii) brazo de homología 3' (de 25 o 30 pb) dentro del CDS.

- G6_Brazo 5': TGGCATGATGCGGGCGCTGACTGCC
- G6_Brazo 3': TCGGATCCCGAATGGGCGCCCATCC
- G9_Brazo 5': GCGTCGCAGATATACTGTCATCGGGGGG
- G9_Brazo 3': AATGGATGGGCACCCATCCGCATCAATGTG

Para la edición de grupos con un único miembro, se diseñó una estrategia de reemplazo génico, mediante la sustitución de ambos alelos del gen por dos genes de resistencia a antibióticos diferentes. Para ello se ensamblaron constructos que incluían: (i) brazo 5' de 40

pb homólogo a la UTR aguas arriba del codón de inicio, (ii) el gen de resistencia y (iii) brazo 3' de 40 pb homólogo a la UTR aguas abajo del codón de terminación.

- G2_Brazo 5': ACAAACATTTTTTTTAACTAAACGGACAAAGACTTTAACA
- G2_Brazo 3': CACAACAGCAAATTTAGCCCCGTTGCCGGTGCCAACTCAT

2. Generación de los ADN donador y los sgRNA

Tanto los ADN donador conteniendo los genes de resistencia, como los ADN codificantes para los sgRNAs, fueron generados mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para lo cual diseñamos y mandamos a sintetizar cebadores específicos. Los oligonucleótidos se adquirieron liofilizados, se resuspendieron en base a su peso molecular a una concentración de 100 μ M, y fueron posteriormente diluidos a una concentración final de 10 μ M con agua libre de DNAsas y RNAsas para su uso en PCR. Como ADN molde para la PCR empleamos vectores plasmídicos con los que cuenta el laboratorio, como el vector pUC sgRNA (Addgene plasmid # 68710) gentilmente cedido por la Dra Lander, y los vectores pGEM BSD y puc AID-HA sintetizados en el laboratorio (**Figura 11**).

En nuestro sistema, el ARN guía (sgRNA) es sintetizado de forma endógena por la ARN polimerasa T7 expresada en la línea modificada pLew T7 RNP SpCas9. Este sgRNA está compuesto por dos regiones: una región estructural denominada *scaffold*, que permite la asociación del sgRNA con la endonucleasa Cas9, y una región específica complementaria a la secuencia blanco, que confiere especificidad al complejo, y permite dirigir la endonucleasa hacia su sitio diana en el genoma.

Para su generación, utilizamos como molde el vector pUC-sgRNA, que contiene la secuencia del *scaffold*, junto con un cebador reverso complementario a dicha región. Por otro lado, diseñamos un cebador forward que incluye una porción del *scaffold* y la secuencia específica del ARN guía, ubicada bajo el control del promotor de la T7 polimerasa (**Tabla 1**). Esta estrategia permite la síntesis eficiente y accesible de un sgRNA funcional, capaz de formar un complejo con Cas9 y dirigirlo con precisión al sitio genómico deseado.

Para generar los ADN donador de la estrategia de reemplazo génico, empleamos el vector pGEM BSD que contiene el gen de resistencia a blasticidina “blasticidina-S deaminasa” (que denominaremos BSD); y el vector puc AID-HA que contiene el gen de resistencia a puromicina “puromicina acetiltransferasa” (que denominaremos PURO). Diseñamos un par de cebadores con 40 nucleótidos específicos homólogos a la UTR y 20 nucleótidos complementarios al gen de resistencia correspondiente (**Tabla 2**). Por otro lado, para la estrategia de interrupción génica por inserción de codones *stop*, se diseñaron ADN donador específicos que fueron sintetizados comercialmente por IDT.

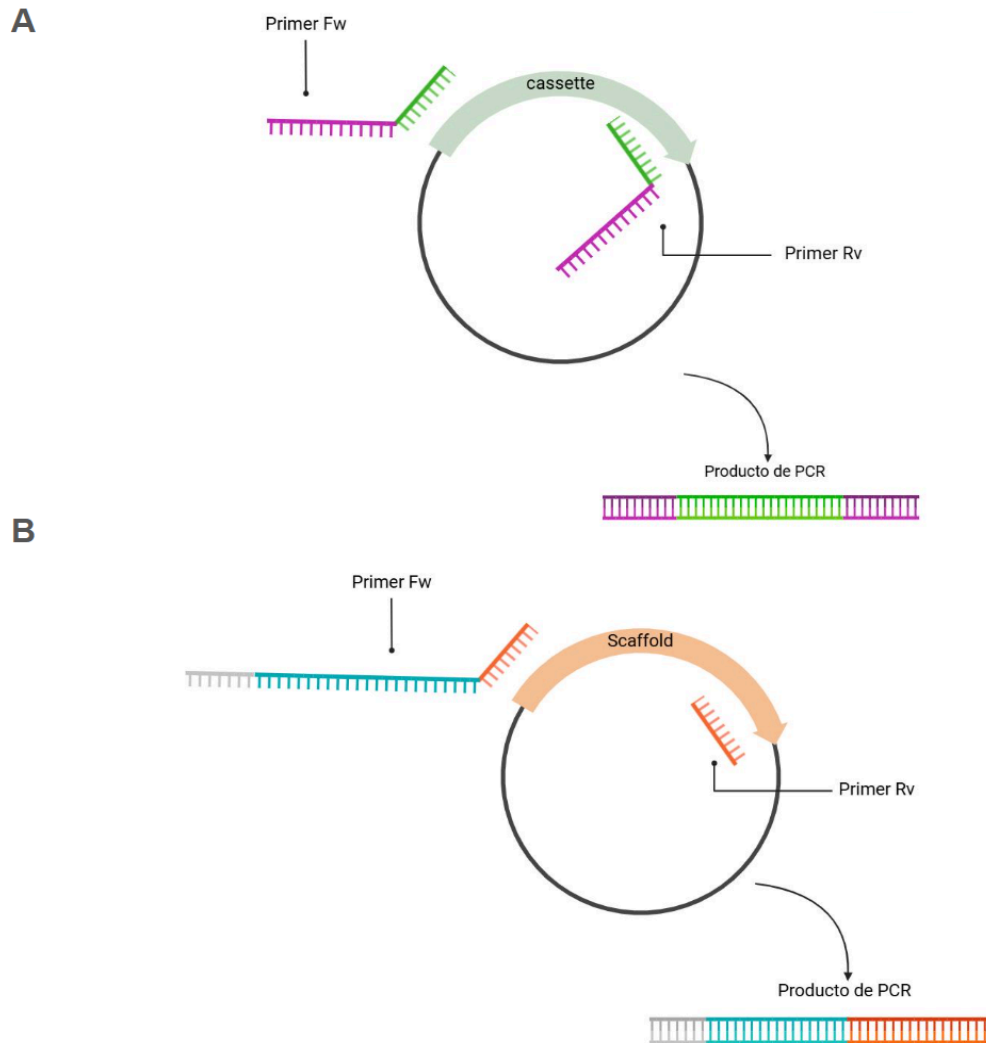


Figura 11. Generación de los ADN donador y construcción de los sgRNAs. (A) Generación de los ADN donador para el reemplazo génico, con dos brazos de homología específicos para las regiones 5' y 3' UTR del gen blanco (en fucsia) y el gen de resistencia (verde). Los moldes de ADN empleados fueron pGEM BSD (vector con gen de resistencia a blasticidina) y puc AID-HA (vector con gen de resistencia a puromicina). (B) Generación del ADN codificante para el sgRNA, que incluye el promotor de la polimerasa T7 (gris), la secuencia específica del sgRNA (turquesa) y el scaffold (naranja). El ADN molde utilizado fue el vector puc sgRNA

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la generación del ADN codificante para los sgRNAs

Nombre	Secuencia (5'→3')	Observaciones
Fw sgRNA G2_1	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACT CACTATAGTGACTGGCACGAGTGCC CCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	Promotor T7 + 20 pb específicos + inicio del <i>scaffold</i>
Fw sgRNA G2_2	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACT CACTATAGAAAGTGTCCAGATATGA GGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	

Fw sgRNA G6_1	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACT CACTATAGGGAGAGAGTCTTCACGG AGGATCTGAGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAG	
Fw sgRNA G6_2	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACT CACTATAGGGAGAGATCAGCGGTGCA GTATCTTGAGTTTTAGAGCTAGAAAT AGCAAG	
Fw sgRNA G9_1	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACT CACTATAGGGAGAGATCTGTGCTGCA ATACATACGTTTTAGAGCTAGAAATAG CAAG	
Fw sgRNA G9_2	GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACT CACTATAGGGAGAGAATACATACTGG TATTATGCGTTTTAGAGCTAGAAATAG CAAG	
Rv Scaffold SpCas9	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT	Final del <i>scaffold</i>

Nota: En negrita se indica la secuencia específica (20 pb) de cada sgRNA.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la generación del ADN donador		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Observaciones
G2_Fw donador 5' UTR_PURO	ACAAACATTTTTTTTAACTAAACGGA CAAAGACTTTAACAATGACCGAGTAC AAGCCCAC	40 pb homología + inicio del gen PURO
G2_Rv donador 3' UTR_PURO	CACAACAGCAAATTTAGCCCCGTTGC CGGTGCCAACTCATTTCAGGCACCGGG CTTGCGGG	40 pb homología + final del gen PURO
G2_Fw donador 5' UTR_BSD	ACAAACATTTTTTTTAACTAAACGGA CAAAGACTTTAACAATGGCCAAGCCT TTGTCTCA	40 pb homología + inicio del gen BSD
G2_Rv donador 3' UTR_BSD	CACAACAGCAAATTTAGCCCCGTTGC CGGTGCCAACTCATTTCAGGCACCGGG CACATAAC	40 pb homología + final del gen BSD
G6 donador Stop	TGGCATGATGCGGGCGCTGACTGCC TAGATAGATAGGAATTCCTGTGTGAAA TTGTTATCCGCTCGGATCCCGAATGGG CGCCCATCC	25 pb de homología + constructo + 25 pb de homología
G9 donador Stop	GCGTCGCAGATATACTGTCATCGG GGGGTAGATAGATAGGGATCCCCTGTG TGAAATTGTTATCCGCAATGGATGGGC ACCCATCCGCATCAATGTG	30 pb de homología + constructo + 30 pb de homología

Nota: En negrita se indica el brazo de homología de cada cebador/ADN donador.

Las PCR fueron realizadas con 1 μ L de Phusion High-Fidelity DNA Polymerase de Invitrogen, Buffer GC 5X, DMSO 3%, 10 mM de dNTPs, 10 μ M de cada cebador y 30 ng de ADN molde en un volumen final de reacción de 100 μ L. Se utilizó el termociclador TC1000G (DLAB) con el siguiente programa de termociclado:

- Desnaturalización inicial: 98 °C – 5 min
- 5 ciclos: 98 °C – 30 s; 56 °C – 30 s; 72 °C – 30 s
- 20 ciclos: 98 °C – 45 s; 65 °C – 45 s; 72 °C – 45 s
- Extensión final: 72 °C – 5 min

Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante precipitación con etanol y acetato de sodio; para ello se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a la muestra, mezclando suavemente por inversión. La mezcla se dejó precipitar en congelador a -20 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 14.000 x g durante 7 minutos en una minifuga y se retiró cuidadosamente el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 70%, mezclando por inversión, y se centrifugó nuevamente a 14.000 xg durante 7 minutos. Para asegurar condiciones de esterilidad, se descartó el sobrenadante y se permitió la evaporación completa del etanol dentro de la cámara de flujo laminar de la sala de cultivo. Finalmente, el ADN precipitado se resuspendió en 20 μ L de agua libre de nucleasas estéril. Se estimó la concentración y el tamaño del amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con GoodView, utilizando 5 μ L de muestra con 1 μ L de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen) y 5 μ L del marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321, Thermo) como referencia.

3. Manipulación de ácidos nucleicos

3.1. Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar una región de interés utilizando el programa OligoAnalyzer (IDT) (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) (**Tabla 3**). En todos los casos, la edición génica fue verificada por PCR utilizando cebadores específicos para el gen y para el ADN insertado, y su especificidad fue confirmada mediante un análisis BLAST contra el genoma completo de la cepa Dm28c, empleando la herramienta Primer-Blast (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Para verificar la edición mediada por la estrategia de reemplazo génico, se diseñó un cebador forward dirigido a la región 5' UTR del gen blanco, junto con cebadores reversos específicos dirigidos tanto al CDS del gen endógeno, como dentro de los genes de resistencia. En la estrategia de disrupción génica por inserción de codones *stop*, la edición se verificó utilizando cebadores específicos dirigidos al CDS y cebadores M13 forward y reverso.

Tabla 3. Cebadores utilizados para evaluar la edición por PCR		
Nombre	Secuencia (5'→3')	T_m
Fw G2_UTR	CAGCGGCCAGAAAGGTCATT	60.9
Rv G2_CDS2	TATACGTCTGCCATGTGCCC	59.8
Rv PURO	AGTTCTTGCAGCTCGGTGAC	60.6
Rv BSD	GAGGGTGGATTCTTCTTGAGAC	62
Fw_G6	CTCTTTTGCCATCGCAGAGC	56.8
Rv_G6	GTCTTCTCCACCGTCTTGGG	57.5
Fw_G9	TTTGCTGCCAGCCTGAAGTA	57.1
Rv_G9	GAGCATTGCCCTGACACTCT	57.4
Fw_M13	CCTGTGTGAAATTGTTATCCGC	54.5
Rv_M13	GCGGATAACAATTCACACAGG	54.5

3.2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de cultivos de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* siguiendo las recomendaciones del protocolo comercial de DNAzol® (Invitrogen) con algunas adaptaciones para el volumen y tipo de muestra. Se recolectaron entre 500 µL y 1 mL de suspensión de parásitos, que fueron centrifugados a 5000 x g durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en 500 µL de reactivo DNAzol®, asegurando la completa lisis de los parásitos. El ADN genómico se precipitó añadiendo 250 µL de etanol absoluto al lisado, mezclando suavemente por inversión hasta homogeneizar. La mezcla se centrifugó a 6000 x g durante 10 minutos, se observó la formación de un pellet de ADN y se descartó cuidadosamente el sobrenadante.

Posteriormente, se procedió a lavar el ADN precipitado con 500 µL de etanol al 75%, mezclando por inversión, y la suspensión fue centrifugada a 6000 x g durante 5 minutos. Tras el lavado, se eliminó el etanol remanente y se dejó evaporar el resto del solvente dejando el tubo abierto durante aproximadamente 15 segundos. El ADN precipitado se resuspendió en 50 µL de NaOH 8 mM y se dejó hidratar a 4°C durante toda la noche para garantizar una adecuada solubilización, para ser finalmente almacenado a -20°C. La cuantificación y la evaluación de la pureza del ADN obtenido se realizó mediante espectrofotometría mediante NanoDrop™.

3.3. PCR a tiempo final para verificar edición

Se realizaron las PCR con la mezcla comercial Mango Mix (2X) (Bioline), que contiene el buffer de reacción, la Taq Polimerasa, el MgCl₂ y los dNTPs, añadiendo 10 µM de cada

cebador y 100 ng de ADN genómico molde. Se utilizó el termociclador TC1000G (DLAB) con el siguiente programa de termociclado:

- Desnaturalización inicial: 95 °C – 5 min
- 35 ciclos: 95 °C – 30 s; 56 °C – 30 s; 72 °C – 30 s
- Extensión final: 72 °C – 5 min

Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X, teñido con GoodView. Se sembraron 10 µL de producto de PCR y 5 µL de un marcador de peso molecular adecuado: GeneRuler 50 bp DNA Ladder o GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 20 minutos y el gel fue visualizado en transiluminador UV.

4. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

4.1 Extracción de ARN total

El ARN total se obtuvo a partir de cultivos de epimastigotas en fase exponencial de *Trypanosoma cruzi* empleando el kit Direct-zol™ RNA Miniprep Plus (Zymo Research), siguiendo las indicaciones del fabricante con adaptaciones menores para el tipo de muestra. Previamente a la extracción, se prepararon los reactivos según las recomendaciones del kit. Para cada extracción, se centrifugó 1 mL de cultivo a 2800 x g durante ocho minutos, y el pellet resultante se resuspendió cuidadosamente en 1 mL de TRIzol® para asegurar una lisis completa y homogénea de los parásitos. Las muestras en TRIzol® se procesaron de forma inmediata, para preservar la integridad del ARN. La purificación se realizó a temperatura ambiente, aplicando centrifugaciones de 30 segundos a 14,000 x g. Una vez añadido un volumen de etanol absoluto a la muestra, se transfirió la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IIIICG, centrifugando para permitir la unión del ARN a la matriz y descartando el flujo.

Para eliminar restos de ADN genómico, se aplicó un tratamiento en columna con DNasa I. Este consistió en un primer lavado con 400 µL de RNA Wash Buffer, seguido de la aplicación de una mezcla compuesta por 5 µL de DNasa I (6 U/µL) y 75 µL de DNA Digestion Buffer, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la columna se lavó dos veces con 400 µL de Direct-zol™ RNA PreWash, descartando el flujo en cada paso, y se realizó un lavado final con 700 µL de RNA Wash Buffer, centrifugando durante un minuto. Finalmente, el ARN se eluyó añadiendo 50 µL de agua libre de nucleasas directamente sobre la matriz de la columna y recuperando el eluido mediante centrifugación. Una alícuota de 5 µL fue utilizada para la cuantificación y evaluación de la pureza por espectrofotometría NanoDrop™ y el resto se almacenó a -70 °C hasta su uso.

4.2 Síntesis de cDNA y RT-qPCR

Antes de la retrotranscripción, el ARN purificado se sometió a un tratamiento adicional con DNasa I para asegurar la completa eliminación de ADN genómico residual. Cada reacción contenía 2,5 µg de ARN total en un volumen final de 11 µL, compuesto por 1,1 µL de buffer DNasa 10X, 1 µL de DNasa I (10 U/µL) y agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C para permitir la digestión, y la enzima fue inactivada con un paso de 75 °C durante 1 minuto.

La síntesis de ADN complementario (cDNA) se realizó con la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) y oligo(dT) como cebador. A la reacción de ARN tratado se añadieron 1 µL de dNTPs (10 mM) y 1 µL de oligo(dT) (0,5 µg/µL), incubando a 65 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se incorporaron 1 µL de DTT (0,1 M), 4 µL de buffer 5X y 1 µL de la enzima SuperScript II, completando un volumen final de 20 µL. La retrotranscripción se llevó a cabo en tres etapas: 5 minutos a 25 °C, 50 minutos a 42 °C y una inactivación final de 15 minutos a 75 °C. Las muestras se enfriaron inmediatamente en hielo y fueron almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Se incluyó un control negativo para cada muestra (reacción sin retrotranscriptasa) con el fin de descartar amplificaciones provenientes de ADN genómico.

Previo a los ensayos de RT-qPCR (PCR cuantitativa con transcripción reversa), se verificó la integridad y la ausencia de contaminación genómica en los cDNA mediante PCR convencional. Para ello, se emplearon dos juegos de cebadores: uno dirigido a detectar ADN genómico (Fw m-TXNPx - Rv Ciclofilina) y otro como control positivo que amplifica el gen constitutivo triosa fosfato isomerasa TIM (Fw TIM - Rv TIM). Para optimizar la PCR, inicialmente se evaluaron diluciones 1/10 y 1/20 de los cDNA. Asimismo, se diseñaron cebadores óptimos para la RT-qPCR que amplifican un producto menor a 150 pb, dirigidos al CDS del gen blanco (G2) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Cebadores utilizados para la RT-qPCR		
Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm
Fw G2_interno	GTTGGCGCCATGAGCTTTAG	59.0
Rv G2_interno	TGGAAACGCTGCTGAGCATA	60.0
Fw TIM	GCTTCCATGTCATCGTCTGT	62.1
Rv TIM	GAGACCACGCCTCCTTACTA	62.4

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron utilizando el método de detección con SYBR™ en un termociclador QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). Cada reacción, en un volumen total de 10 µL, contenía 5 µL de SensiFAST™ SYBR® No-ROX

Mix, 0,4 μ L de cada cebador (10 μ M), 2 μ L de cDNA y 2,2 μ L de agua libre de nucleasas. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 30 segundos. Se realizó un análisis de curva de disociación (melting curve) desde 65 hasta 95 °C, incrementando la temperatura 0,5 grados cada 5 segundos para confirmar la especificidad de los productos amplificados, así como la ausencia de dímeros de cebadores.

La expresión relativa del gen blanco se calculó aplicando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), normalizando los valores obtenidos respecto al gen constitutivo TIM, previamente validado como control interno estable en *T. cruzi*. Los ensayos se realizaron con dos réplicas biológicas, cada una con triplicados técnicos, y se incluyeron en cada ensayo controles sin transcriptasa reversa y blancos sin molde (NTC) para descartar contaminaciones o amplificaciones inespecíficas.

5. Cultivo de parásitos y líneas celulares

En este estudio trabajamos con la cepa Dm28c de *T. cruzi* y la línea transformada con el plásmido pLew T7 RNP SpCas9, gentilmente cedido por el Dr. Taylor, que expresa de forma constitutiva a las enzimas SpCas9 y T7 polimerasa (Costa et al., 2018) y denominaremos “pLew”. Los epimastigotas fueron mantenidos en cultivos axénicos en medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco) inactivado por calor. Los epimastigotas se mantuvieron en estufa a 28°C en sala de cultivo de bioseguridad Nivel II. Los subcultivos se realizaron cada 3 días para mantener los parásitos en fase exponencial.

Como modelo de célula hospedera, se utilizaron células epiteliales Vero, derivadas de riñón de *Chlorocebus sabaues*, cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de SFB inactivado, y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 μ g/ml). Se mantuvieron en estufa a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Para la realización de pasajes celulares, se realizó la disrupción de monocapas mediante la incubación con tripsina 0,25% por 3 minutos aproximadamente. Al corroborar la disrupción de la monocapa en el microscopio, la tripsina se neutralizó con medio completo, las células se centrifugaron 10 minutos a 1.500 x g y se resuspendieron en DMEM 10% SFB.

Para la criopreservación de las líneas, éstas fueron centrifugadas (10 minutos a 1.500 x g para las células Vero, 10 minutos a 2.800 x g para los epimastigotas y 15 minutos a 3.500 x g para los tripomastigotas) y resuspendidas en un 1 mL de medio crioprotector de SFB 10% DMSO. Las suspensiones se distribuyeron en viales criogénicos y se almacenaron a -70°C.

6. Transfección y selección de los epimastigotas

La transfección fue realizada mediante nucleofección utilizando el sistema Amaxa Nucleofector II ®, con dos pulsos del programa X-014. Por condición se emplearon 2×10^7 epimastigotas de la línea pLew en fase exponencial, que fueron resuspendidos en solución de electroporación (Buffer Tb-BSF: 90mM NaH₂PO₄, 5mM KCl, 0,15mM CaCl₂, 50mM Hepes pH 7,3) y mezclados con el ADN donador correspondiente (10 µL en el caso de ADN donador generado por PCR, o 50 µg de ADN donador comercial), y 10 µL de cada sgRNA en un volumen final de 100 µL. Finalmente transferimos los parásitos a 3 mL de medio fresco LIT 10% SFB.

Para la generación de líneas *knockout* mediante reemplazo génico, se realizaron dos transfecciones secuenciales. En una primera etapa se nucleofectó con el ADN donador con el gen de resistencia a puromicina, junto con los dos sgRNA como se describió previamente. La selección de los parásitos comenzó a las 24 horas de la transfección, agregando 10 µg/mL de puromicina, que fue renovada semanalmente. Una vez seleccionada la línea resistente a puromicina, se verificó la integración del gen mediante PCR (como fue descrito anteriormente).

En una segunda etapa, se realizó otra ronda de nucleofección con el ADN donador con el gen de resistencia a blasticidina. La selección se realizó con 20 µg/mL de blasticidina, que fue renovada semanalmente, y una vez obtenida una línea resistente, verificamos por PCR la inserción del gen. En ambos casos, para evaluar la selección se monitoreó mediante microscopía la viabilidad y proliferación de la línea transfectada respecto a una línea control de transfección (sin donador ni sgRNA). Las poblaciones resistentes fueron luego mantenidas con la mitad de la concentración de ambos antibióticos hasta su análisis molecular.

7. Aislamiento clonal por deposición de célula única

Se realizó aislamiento clonal por deposición de célula única mediante citometría de flujo con un citómetro FACSAria™ Fusion (BD Biosciences) en la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur. En primer lugar, se cuantificaron los parásitos y se ajustó la concentración a 2×10^6 parásitos/mL. La suspensión celular fue filtrada para eliminar agregados celulares, y se transfirió a tubos de citometría, para inmediatamente realizar el *Cell Sorting*, con la deposición de una célula individual en cada pocillo. Se sembraron 48 pocillos individuales por línea, en placas previamente preparadas con 300 µL de medio LIT 20% SFB, que fueron incubadas en condiciones de humedad adecuadas. Los clones viables fueron luego expandidos, evaluándose la edición por PCR tal como se describe en la metodología.

8. Curva de crecimiento de epimastigotas

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento en condiciones controladas, comparando la línea control (pLew) y la línea editada deficiente en G2 (G2 -/-), incluyendo también un control de medio LIT sin parásitos. Se cuantificaron los parásitos y se ajustó la concentración a 5×10^6 parásitos/mL, sembrando 100 μ L por pocillo en placas de 96 pocillos, con seis réplicas por condición. La densidad óptica (DO) se registró durante un período de 10 días, utilizando un lector de placas ELx800 (BioTek Instruments), registrando la absorbancia a una DO de 630 nm como estimación indirecta de la concentración celular. Los datos fueron procesados para graficar el aumento en la cantidad de parásitos a lo largo del tiempo, comparando la cinética de crecimiento de las distintas líneas.

9. Metaciclologénesis *in vitro*

Para inducir la diferenciación de epimastigotas pLew y G2 -/- a tripomastigotas metacíclicos, se utilizó el protocolo de Contreras (1985). Los epimastigotas en fase exponencial fueron recolectados y resuspendidos en 250 μ L de medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 8 mM Buffer Fosfato, pH 6) a una concentración de 50×10^7 parásitos/mL. La incubación en TAU se realizó a 28 °C durante 2 horas para inducir un estrés nutricional controlado. Transcurrido este período, los parásitos fueron diluidos 1/100 en un volumen final de 2 mL en medio TAU 3AAG (que consiste en medio TAU suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM ácido L-glutámico, 2 mM ácido L-aspártico y 10 mM D-glucosa). La incubación en TAU 3AAG se mantuvo a 28 °C durante 72 - 96 horas, tiempo en el cual los parásitos completan su diferenciación a tripomastigotas metacíclicos.

Finalmente, los tripomastigotas metacíclicos fueron recuperados del sobrenadante, centrifugados 15 minutos a 3500 x g, y resuspendidos en 200 μ L de DMEM 10% SFB. Los tripomastigotas metacíclicos fueron utilizados para infectar células Vero y obtener posteriormente tripomastigotas derivados de células.

10. Ensayos de infección *in vitro*

10.1 Protocolo de infección con tripomastigotas metacíclicos

Se infectaron monocapas de células Vero al 60% de confluencia en frascos de 25 mL, con tripomastigotas metacíclicos, con una multiplicidad de infección de 10 parásitos por célula. La incubación se llevó a cabo durante 20 horas a 37°C en medio DMEM 2% SFB. Posteriormente, se removieron los parásitos no internalizados mediante 2 lavados con PBS 1X, y se agregó medio fresco. A los 4 días post-infección se recogieron los tripomastigotas

derivados de células liberados al sobrenadante para ser utilizados en ensayos de infección *in vitro*.

10.2. Cuantificación de tripomastigotas en sobrenadante

Para evaluar la capacidad infectiva de los tripomastigotas pLew y G2 -/- derivados de células, se realizaron ensayos de infectividad utilizando células Vero en placas de 6 pocillos. Para esto se utilizaron células Vero mantenidas con una confluencia estimada del 80%, que fueron lavadas con PBS 1X, tripsinizadas y centrifugadas 10 minutos a 1500 x g para recolectar el pellet celular. Posteriormente, se resuspendieron en medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y se cuantificaron bajo el microscopio en una cámara de conteo descartable. Se sembraron 1×10^5 células en cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 5% CO₂ para permitir la adhesión de las células a la superficie.

Los tripomastigotas de cada una de las líneas se contaron mediante microscopía y se agregaron a cada pocillo (tres réplicas para cada línea), con una multiplicidad de infección de 10 o 3 parásitos por célula, incubando a 37°C en medio DMEM 2% SFB durante 3 o 20 horas, respectivamente. Posteriormente, las monocapas se lavaron cuidadosamente con 1 mL de PBS 1X para eliminar parásitos no internalizados y se reemplazó el medio por 1 mL de DMEM 2% SFB para mantener las condiciones óptimas de cultivo. A las 96 y 120 horas post-infección, se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos de células infectadas. Los tripomastigotas se fijaron en PBS 4% Formaldehído, y se cuantificaron en cámara de conteo celular por microscopía.

10.3. Análisis de la capacidad de invasión y replicativa

Para evaluar procesos vinculados a etapas tempranas de la infección, se realizó un ensayo de infectividad *in vitro* complementario, en el cual cuantificamos la capacidad de invasión y replicación intracelular de las líneas pLew y G2 -/-. El ensayo se llevó a cabo en placas de cultivo de 12 pocillos (Corning Inc., Corning, USA), en las que cada pocillo se preparó colocando un cubreobjetos redondo esterilizado. Las células Vero fueron tripsinizadas y cuantificadas con cámara de conteo celular. Se ajustó la concentración celular y se sembraron 1×10^5 células en cada pocillo en un volumen de 1 mL.

Los tripomastigotas se contaron individualmente y se agregaron 2×10^5 parásitos por pocillo, con 3 réplicas por línea, para obtener una multiplicidad de infección de 2 parásitos por célula. La infección se permitió incubando las placas 24 horas a 37 °C y 5% CO₂ para favorecer la interacción e invasión de los parásitos. Al día siguiente de la infección, las monocapas se lavaron cuidadosamente con PBS 1X para eliminar parásitos no internalizados y se adicionó 1 mL medio fresco DMEM 2% SFB.

A las 48 horas post-infección, las células infectadas fueron lavadas cuidadosamente con PBS 1X para eliminar restos del medio de cultivo y parásitos extracelulares residuales. A continuación procedimos con la preparación de la muestra para su análisis por microscopía de epifluorescencia. Para la fijación y permeabilización, se añadió a cada pocillo 400 μ L de etanol absoluto a 4°C, cubriendo completamente cada pocillo, y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se retiró el etanol y se reemplazó por PBS 1X, continuando con el procesamiento para inmunofluorescencia indirecta.

10.4. Inmunofluorescencia indirecta

Para bloquear sitios inespecíficos, se incubaron los pocillos durante 30 minutos con 250 μ L de BSA 2% en PBST 0.1% (PBS 1X 0.1% Tween-20). Luego del bloqueo, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario de conejo anti-c-TXNPx (que reconoce una peroxiredoxina citosólica) diluido 1:10000 en BSA 2% PBST. Se añadieron 250 μ L de esta mezcla por pocillo y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con PBST 0.1%, incubando 5 minutos en cada lavado.

Posteriormente, se incubaron las muestras con la mezcla de anticuerpo secundario y DAPI para la tinción de núcleos y kinetoplastos. Se utilizó un anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG, diluido 1:1000 en BSA 1% en PBST. Simultáneamente, se añadió DAPI (5mg/ml) a una dilución de 1:1000 en PBS. Se distribuyó un volumen de 250 μ L por pocillo y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Luego de la incubación, se realizaron tres lavados adicionales con PBST 0.1% para eliminar anticuerpos y colorante no unidos.

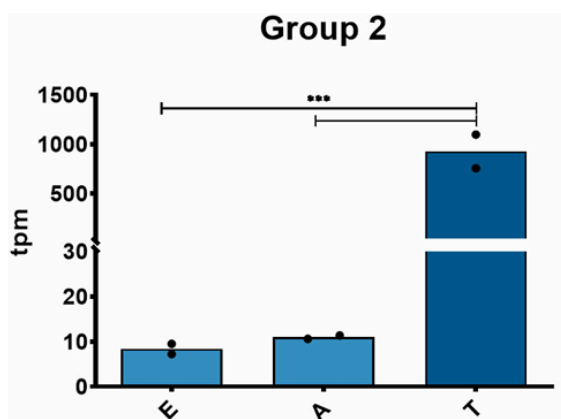
Para el montaje, se colocaron 10 μ L de líquido de montaje sobre cada portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos procurando evitar burbujas. Las preparaciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Finalmente, las muestras fueron observadas con microscopio de epifluorescencia. Mediante la inmunofluorescencia indirecta determinamos la capacidad de invasión (porcentaje de células infectadas) y la capacidad replicativa (número de amastigotas por célula infectada) a las 48 horas de la infección.

Resultados

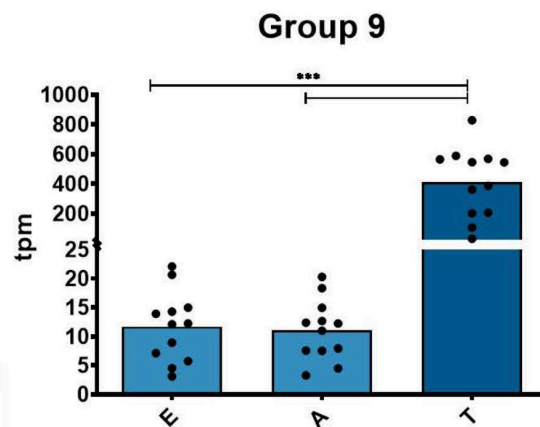
1. Selección de miembros de GP63 como blancos para la edición genómica

Con el objetivo de explorar el rol funcional de un miembro específico de la familia GP63 en el ciclo infeccioso de *Trypanosoma cruzi*, realizamos una selección de candidatos basada en datos transcriptómicos generados por nuestro grupo de investigación (Berná et al., 2025; Díaz-Viraqué et al., 2023). El análisis comparativo entre los principales estadios reveló que varios grupos de GP63 presentan una expresión diferencial en las formas infectivas tripomastigotas, respecto a las formas replicativas epimastigotas y amastigotas. A su vez, entre los grupos diferencialmente expresados, los niveles de expresión en tripomastigotas varían en gran medida (**Figura 12**), con los grupos 2 y 9 presentando una expresión significativamente más alta que el resto (medida en abundancia relativa de transcritos) (Berná et al., 2025).

A.



B.



C.

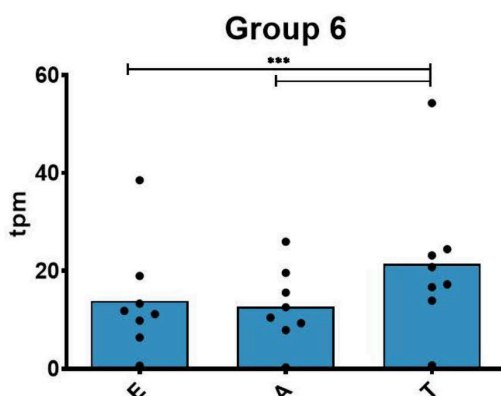


Figura 12. Expresión de miembros de GP63 en los principales estadios de *T. cruzi*. Análisis transcriptómico basado en datos de RNA-Seq que muestra la abundancia relativa de transcritos de cada grupo de GP63 en epimastigotas (E), amastigotas (A) y tripomastigotas (T). Los niveles de expresión se representan como transcritos por millón (TPM) para cada estadio. (A) Grupo 2, (B) grupo 9 y (C) grupo 6. (Berná et al., 2025; Díaz-Viraqué et al., 2023).

En particular, el grupo 2 (G2) es el miembro más abundante a nivel de ARN mensajero en la forma tripomastigota, sugiriendo un posible rol en procesos asociados a la virulencia. Este grupo está conformado por dos copias haplotípicas (alelos) de un gen de copia única (anotados como C4B63_271g8 y C4B63_43g199 en el genoma de Dm28c de TriTrypDB). A diferencia de otros miembros de la familia, el grupo 2 no posee predicción de anclaje a GPI, lo que sugiere que podría corresponder a formas secretadas o solubles. Asimismo, dentro del sitio activo de las metaloproteasas, los residuos esenciales en la actividad catalítica His (H) y Glu (E) del motivo HEXXHXXG se encuentran conservados, indicando que G2 probablemente sea un grupo catalíticamente activo con funciones que podrían ser similares a las descritas en GP63 de *L. major*. Estas características lo convirtieron en un candidato ideal para los ensayos de edición génica y análisis funcional.

Las secuencias genómicas correspondientes a los dos haplotipos de G2 fueron recuperadas de TriTrypDB, y alineadas empleando el software Clustal Omega. El alineamiento evidenció que en uno de los haplotipos el codón de inicio anotado coincide con un ATG que se encuentra en posición interna en la otra secuencia (**Figura 13**). El análisis de la región 5' aguas arriba de este ATG interno mostró un contenido elevado de adenina y timina, lo que sugiere que esta zona probablemente pertenezca a la UTR, y no a la región codificante. Además contamos con evidencia proteómica que apoya esta observación, ya que no hemos podido identificar en estudios de espectrometría de masa, péptidos correspondientes a dicha región. Por esta razón, se consideró que el ATG interno probablemente sea el sitio real de inicio de traducción en ambos haplotipos. Al tomar este ATG como referencia, las secuencias codificantes predicen proteínas de longitudes equivalentes y presentan un 98% de identidad en su secuencia aminoacídica.

C4B63_43g199	1	ATGCGGTTTTGTCATCTTACTGGTGTACGGCCTTTTTTTTTTCTTTCCAC	50
C4B63_271g8	1	-----	0
C4B63_43g199	51	TCTTATTTTTGTGCAAATACACACCACCACCCCTGGTGAAGATCAGA	100
C4B63_271g8	1	-----	0
C4B63_43g199	101	AACTTTTTGTGACTGCTGTTATCCGTGACGCTTTCACGCTTTGCGTACCT	150
C4B63_271g8	1	-----	0
C4B63_43g199	151	TTTTCTACCCCGTTGCCACTGCTTCTTTGTGGCCATTCCACACCACAG	200
C4B63_271g8	1	-----	0
C4B63_43g199	201	AGGATTACAGCCTTATTTCAAGCTCCACAAACATTTTTTTAACTAAAC	250
C4B63_271g8	1	-----	0
C4B63_43g199	251	GGACAAAGACTTTAACAATGCGTCGGCCACTTTTCACCACAATCATTACG	300
C4B63_271g8	1	-----ATGCGTCGGCCACTTTTCACCACAATCATTACG	33
C4B63_43g199	301	TTGTTCTTGTGTCAGCTGCTGGGCTGCTCCATTGGCTGCCTCGCTCTCTC	350
C4B63_271g8	34	TTGTTCTTGTGTCAGCTTCTGGGCTGCTCCATTGGCTGCCTCGCTCTCTC	83

Figura 13. Alineamiento de secuencias nucleotídicas del G2 de GP63 de *T. cruzi*. Se observa que el codón de inicio (ATG) anotado para C4B63_271g8 corresponde a un ATG interno en la secuencia de C4B63_43g199.

Por otro lado, nos propusimos poner a prueba una estrategia alternativa de edición génica más desafiante, para la cual seleccionamos otros grupos que reúnen varios genes con alta identidad de secuencia. Particularmente el grupo 9 (G9), como se mencionó anteriormente, reúne genes que presentan una expresión elevada y diferencial en el estadio tripomastigota. Además posee una mutación en su sitio activo, que sugiere una posible pérdida de su actividad catalítica. Esta característica convierte al grupo 9 en un candidato interesante para explorar su rol en el ciclo infectivo y evaluar funciones novedosas que pudiera haber adquirido. Finalmente, también se seleccionó al grupo 6 (G6) por tratarse de un grupo canónico de expresión baja, lo cual brinda la posibilidad de abordar diversas hipótesis relacionadas con la función basal de estos genes en distintas etapas del ciclo de vida del parásito.

2. Generación de mutantes mediante CRISPR-Cas9

Para generar líneas mutantes para miembros de GP63, la edición génica fue realizada utilizando la metodología CRISPR-Cas9. Esta tecnología fue recientemente adaptada con éxito para su uso en tripanosomátidos, incluyendo *T. cruzi*, y ha demostrado ser eficaz para la edición dirigida de genes individuales o miembros de familias multigénicas (Lander et al., 2016). En nuestro caso, diseñamos ARN guías específicos para la región codificante de los genes blanco, junto con ADN donors con dos brazos de homología flanqueando una secuencia de interés. De este modo, una vez que la enzima dirigida por el sgRNA realiza el corte doble hebra, al contar con un molde de ADN adecuado, esta rotura es reparada por la maquinaria de recombinación homóloga de la célula (Chiurillo & Lander, 2021).

2.1 Diseño y generación del sistema de edición

Para el diseño de los ARN guía utilizamos herramientas computacionales (EuPaGDT: <http://grna.ctegd.uga.edu/batch.html>) que evalúan aquellas regiones cuya secuencia puede usarse como ARN guía, en base a su cercanía a una región PAM reconocida por la enzima Cas9 utilizada, que hipotéticamente realiza un corte doble hebra 3 nucleótidos desde la región PAM hacia el extremo 5'. Se identificaron regiones comunes entre los miembros de un mismo grupo, seleccionando para cada uno dos secuencias candidatas de sgRNA con una buena eficiencia de corte, un alto puntaje y una baja cantidad de *off-targets* (Tabla 5). Se optó por incluir dos sgRNAs, priorizando dirigir uno a la hebra codificante y otro a la molde, estrategia que se ha reportado aumenta la probabilidad de corte y maximiza la eficiencia de edición.

Tabla 5. Características de los ARN guías elegidos para la edición de G2

gRNA ID	Secuencia (5'→3')	Score total	Eficiencia Doench (2014)	Eficiencia CRISPRater	On-target	On-target mismatch	Off-target	Off-target mismatch

					perfect match		perfect match	
C4B63-271g8_1434	TGACTGG CACGAGT GCCCG	0.87	0.48	0.92	1	0	0	0
C4B63-271g8_1509	AAAGTGT CCCAGAT ATGAGG	0.82	0.60	0.77	1	0	0	0

Nota: Valores tomados de la lista de top-ranking gRNAs para 271g8 en EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu/batch.html>).

El diseño de los ADN donors se realizó manualmente y se utilizó el software ApE para visualizar de forma esquemática la arquitectura del donador. Considerando que los grupos 6 y 9 reúnen varios genes cada uno, optamos por una estrategia de disrupción génica por inserción de codones stop, que se basó en el empleo de un ADN donador con una secuencia M13 universal para verificar la edición, y varios codones stop en distintos marcos de lectura, que conducen a la interrupción de la traducción, generando un péptido truncado no funcional.

Dado que el grupo 2 está constituido por dos copias haplotípicas de un gen de copia única, se diseñó una estrategia de reemplazo génico, dirigida a sustituir ambos alelos por dos genes de resistencia diferentes. Para dirigir la recombinación homóloga, se diseñaron dos ADN donors portando los genes de resistencia a puomicina y blasticidina, flanqueados por brazos de homología correspondientes a las regiones 5' y 3' UTR del gen blanco. El alineamiento (BLAST en TriTrypDB) de ambos haplotipos confirmó una alta identidad, lo cual permitió usar un único diseño para ambos alelos, enfoque que reduce el número de construcciones necesarias. En la **Figura 14** se presenta un diagrama de los ADN donador diseñados para ambas estrategias.

Los productos de ADN codificante para los sgRNAs y los ADN donador con genes de resistencia fueron generados mediante PCR a tiempo final de alta fidelidad utilizando cebadores específicos, y posteriormente purificados según lo indicado en la sección de Metodología. La presencia e integridad de los productos purificados fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, observándose bandas únicas del tamaño esperado sin presencia de productos inespecíficos (**Figura 15**). Tanto los sgRNAs como los ADN donador para los tres grupos se diseñaron, sintetizaron y purificaron de forma exitosa.

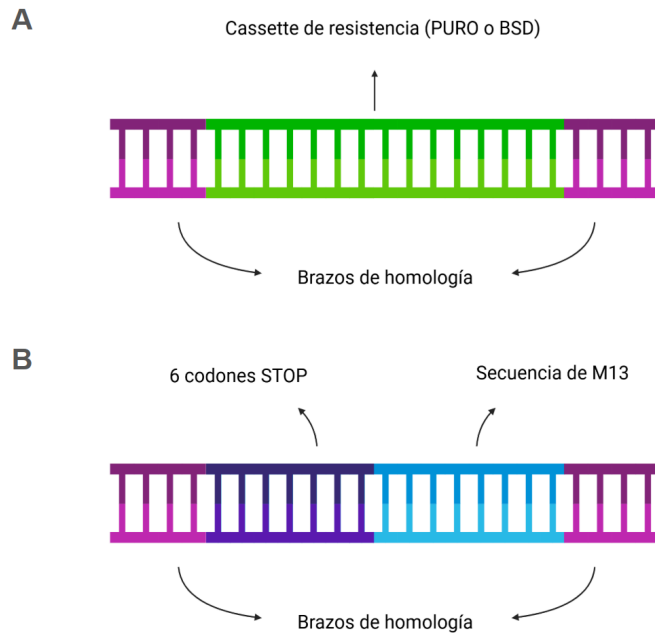


Figura 14. Esquema de los ADN donador diseñados para las dos estrategias de edición. (A) ADN donador diseñado para la estrategia de reemplazo génico, con los dos brazos de homología y el gen de resistencia a puromicina (PURO) o blasticidina (BSD). **(B)** ADN donador diseñado para la estrategia de interrupción génica por inserción de codones stop, con los dos brazos de homología, los 6 codones stop en distintos marcos de lectura y la secuencia M13 para verificar la edición.

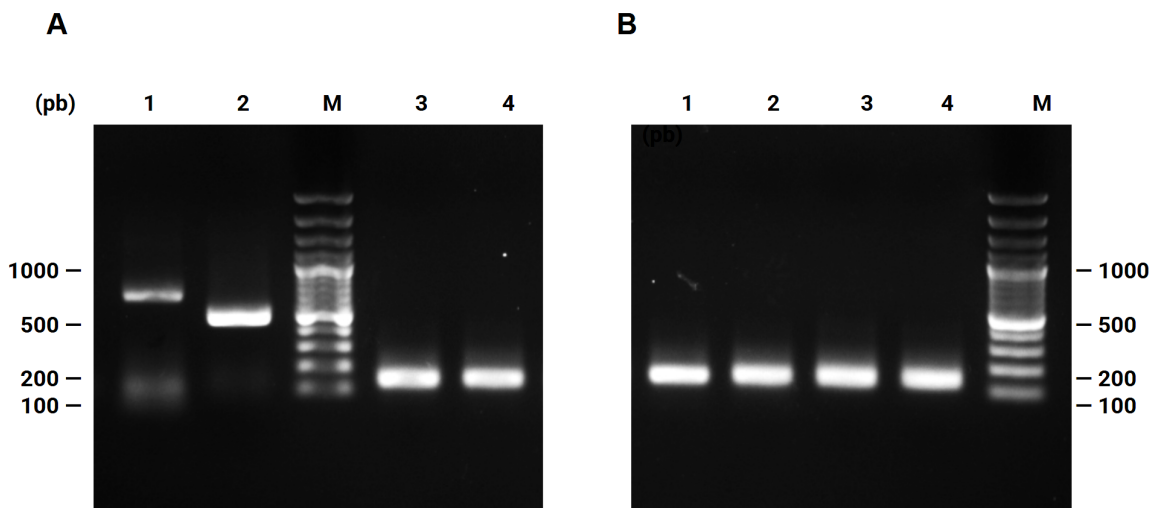


Figura 15. Análisis por electroforesis en gel de los productos de PCR purificados. En la imagen se indican los tamaños de las bandas de referencia del marcador de peso molecular (M) GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder. (A) Carril 1: donador PURO (680 pb). Carril 2: donador BSD (479 pb). Carriles 3 y 4: sgRNAs específicos para G2 (187 pb). **(B)** Carriles 1 y 2: sgRNAs específicos para G6 (187 pb). Carriles 3 y 4: sgRNAs específicos para G9 (187 pb).

2.2 Transfección y selección de epimastigotas

La estrategia de edición génica se llevó a cabo mediante nucleofección utilizando el sistema Amaxa Nucleofector II®, a través del cual epimastigotas de la línea pLew (que expresa constitutivamente Cas9 y T7 RNA polimerasa) fueron nucleofectados con el ADN donador y el ADN codificante para el sgRNA (**Figura 16**).

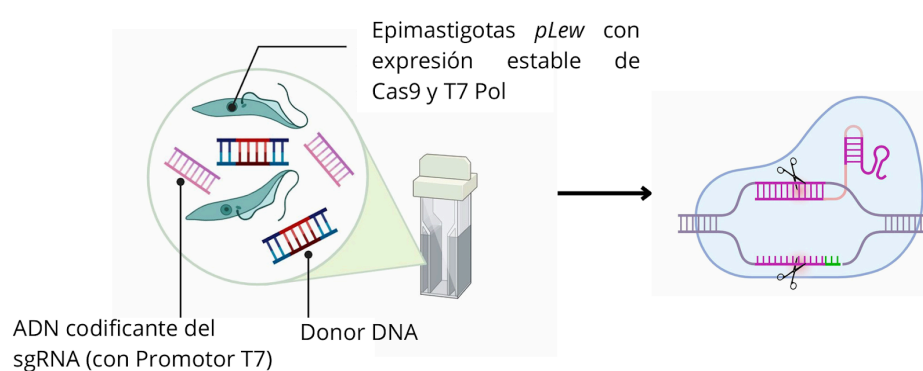


Figura 16. Diagrama del procedimiento de edición de epimastigotas mediante CRISPR-Cas9. Se muestra la incorporación del ADN codificante para el sgRNA y el ADN donador, en la línea modificada pLew (que expresa constitutivamente Cas9 y T7 Polimerasa).

Para la estrategia de interrupción génica por inserción de codones stop, optamos por realizar dos rondas de transfección con el objetivo de maximizar la eficiencia de edición. Tras ambas transfecciones logramos obtener poblaciones viables de epimastigotas (que llamaremos G6 y G9-stop) lo que evidencia que el protocolo empleado, así como las condiciones experimentales, resultaron adecuadas para mantener la viabilidad celular.

En cuanto a la estrategia de reemplazo génico, se implementaron dos transfecciones de forma secuencial. Este diseño buscó favorecer la integración dirigida mediante recombinación homóloga y permitir la selección diferencial de los parásitos editados. En la primera etapa se transfirió el ADN donador conteniendo el gen de resistencia a puromicina. La presión de selección se inició a las 24 horas post-transfección mediante la adición de puromicina, que se renovó semanalmente. Durante este período, se monitoreó por microscopía la viabilidad, morfología y densidad poblacional de los epimastigotas transfectados respecto al control en medios con antibiótico. Luego de cuatro semanas bajo selección, se obtuvieron poblaciones viables resistentes a puromicina.

Posteriormente, sobre la línea resistente a puromicina, se avanzó a una segunda ronda de nucleofección, esta vez utilizando el ADN donador con el gen de resistencia a blasticidina. Al igual que en la etapa previa, la selección inició a las 24 horas post-transfección, agregando blasticidina semanalmente. La viabilidad celular se controló regularmente por observación al

microscopio, evaluando la proliferación de los parásitos respecto del control. Finalmente logramos obtener una línea mutante resistente a ambos fármacos (que llamaremos línea editada G2), que fue mantenida en cultivo con ambos antibióticos y respaldada en crioviales a -70°C . En conjunto, estos resultados indican que la estrategia de transfección secuencial con dos genes de resistencia a antibióticos diferentes permitió obtener líneas de *T. cruzi* con integración estable y expresión de ambos genes de resistencia, constituyendo la base para los análisis funcionales posteriores.

3. Caracterización molecular de las líneas generadas

3.1 PCR para detectar la integración del ADN donador

Una vez seleccionada la línea editada G2 resistente a ambos antibióticos, y que las líneas editadas mediante inserción de codones stop (G6 y G9-stop) alcanzaron una densidad poblacional suficiente para los ensayos moleculares, se procedió a la extracción de ADN genómico utilizando el reactivo DNAzol® (Invitrogen). La integridad del ADN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa, y su concentración y pureza se cuantificaron mediante espectrofotometría de gota (NanoDrop™). El rendimiento de la extracción fue alto, por lo que para su utilización en las reacciones de PCR el ADN se diluyó hasta alcanzar una concentración final de $100\text{ ng}/\mu\text{L}$. Asimismo, las muestras presentaron una pureza adecuada para los ensayos de amplificación por PCR, medida en base a la relación de absorbancia 260/280 nm. Los valores obtenidos se presentan en la **Tabla 6**.

Para confirmar la recombinación homóloga en el *locus* objetivo, se verificó la correcta integración del donador mediante PCR a tiempo final con cebadores específicos para la secuencia de ADN insertada. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. En la **Figura 17** se representa un esquema de los cebadores específicos diseñados para verificar la integración siguiendo ambas estrategias.

Tabla 6. Concentración y pureza del ADN genómico extraído		
Línea	Concentración (ng/μL)	Pureza (Abs 260/280)
editada G2	730.3	2.21
pLew	879.2	2.15
G6-stop	830.8	2.13
G9-stop	954.6	2.09
pLew	1382.6	2.08

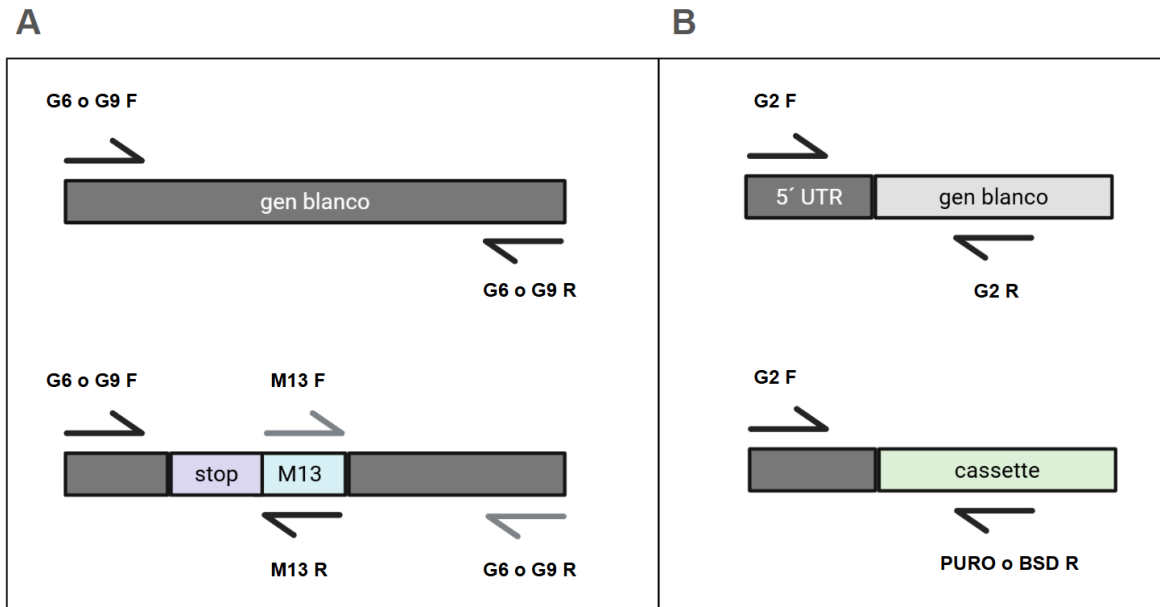


Figura 17. Diseño de cebadores para la verificación de la edición génica. Esquema que muestra la estrategia de PCR para confirmar la integración del ADN donador. **(A)** Para verificar la edición con la estrategia de interrupción génica por inserción de codones stop, se diseñaron distintos pares de cebadores dirigidos al gen blanco y a la secuencia M13. En negro, la combinación de un cebador Forward específico del gen (G6 y G9 F) con un cebador Reverso universal dirigido a la secuencia M13 (M13 R). En gris, la combinación inversa, con un cebador Forward dirigido a M13 (M13 F) y un cebador Reverso específico del gen (G6 y G9 R). **(B)** Para verificar la edición con la estrategia de reemplazo génico se diseñó un cebador Forward común, que hibrida en la región 5' UTR del gen endógeno (G2 F), y cebadores Reversos dirigidos al gen blanco (G2 R) o a los genes de resistencia (PURO o BSD R).

Para verificar la edición con la estrategia de interrupción génica por inserción de codones stop, utilizamos el ADN genómico extraído de la línea control pLew y de las líneas editadas G6-stop y G9-stop. La amplificación por PCR reveló productos específicos de los tamaños esperados para cada combinación de cebadores (**Figura 18**). En las reacciones con cebadores específicos del gen (Fw y Rv), se obtuvieron productos únicos del tamaño esperado: 358 pb para G9 (G9F/G9R) y 788 pb para G6 (G6F/G6R) correspondientes a los genes endógenos en la línea control pLew. En las líneas editadas, los productos amplificados fueron de 307 pb con G9 (línea G9-stop) y 777 pb con G6 (línea G6-stop).

Se realizaron reacciones adicionales utilizando combinaciones de un cebador específico del gen y un cebador universal dirigido a la secuencia M13, presente en el ADN donador. Estas combinaciones amplifican únicamente si el donador fue incorporado correctamente por recombinación homóloga en el sitio esperado. En la línea G9-stop, se detectaron productos de 177 pb con la combinación de un cebador Forward específico del gen G9 (G9F) y un cebador Reverso dirigido a la secuencia M13 (M13R), y de 152 pb con un cebador Forward dirigido a M13 (M13F) y un cebador Reverso específico (G9R). En la línea G6-stop, se obtuvieron productos de 166 pb con la combinación G6F/M13R y de 633 pb con M13F/G6R.

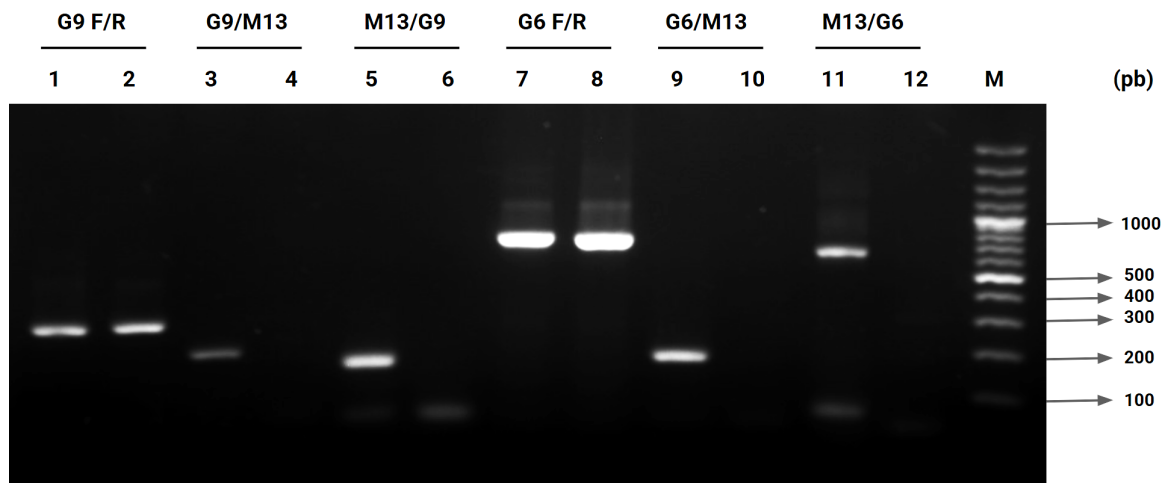


Figura 18. Evaluación por PCR y análisis por electroforesis en gel de agarosa de la interrupción de G6 y G9. En el grupo 9, la línea G9-stop mostró los amplicones esperados con G9F/G9R (carril 1), G9F/M13R (carril 3) y M13F/G9R (carril 5). En contraste, en la línea pLew se detectó únicamente el amplicón de G9F/G9R (carril 2), sin amplificación con G9F/M13R ni M13F/G9R (carriles 4 y 6). En el grupo 6, la línea G6-stop mostró los amplicones esperados con G6F/G6R (carril 7), G6F/M13R (carril 9) y M13F/G6R (carril 11), mientras que en la línea control pLew solo se generó el amplicón con G6F/G6R (carril 8), sin amplificación con G6F/M13R ni M13F/G6R (carriles 10 y 12). M: marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

En conjunto, estos resultados confirman la incorporación específica del ADN donador en los *loci* blanco, validando la edición génica en las poblaciones analizadas. No obstante, considerando que esta estrategia de edición no incluyó un paso de selección de los parásitos editados, es probable que la población analizada sea heterogénea, conteniendo una mezcla de parásitos editados y no editados. Asimismo, dado que ambos grupos reúnen múltiples genes, es esperable que incluso dentro de la población editada, los sitios genómicos modificados difieran entre parásitos.

Para verificar la edición con la estrategia de reemplazo génico, amplificamos por PCR el ADN genómico extraído de la línea control pLew y de la línea editada G2, utilizando cebadores específicos para el gen endógeno G2 y para los genes de resistencia (**Figura 19**). En la línea control pLew, se detectó únicamente el producto correspondiente al gen endógeno G2 con un tamaño esperado de 634 pb, sin amplificación de los genes de resistencia. En contraste, la línea editada G2 únicamente mostró amplificación de productos del tamaño esperado correspondientes a los genes de resistencia a puromicina (593 pb) y a blasticidina (472 pb), sin amplificación de G2. La ausencia de amplificación en el control negativo sin ADN molde (NTC) confirma la especificidad y ausencia de contaminación en las reacciones.

Durante la estandarización de la PCR con el cebador reverso específico para el gen de resistencia a blasticidina (BSD R), se observó la amplificación de un producto inespecífico en la línea control. Para mejorar la especificidad de la reacción, se optimizaron las condiciones de la PCR, aumentando la temperatura de hibridación a 58°C y reduciendo el número total de

ciclos a 30. Estas modificaciones permitieron obtener un único amplicón específico (en la línea editada G2) correspondiente al gen de blasticidina.

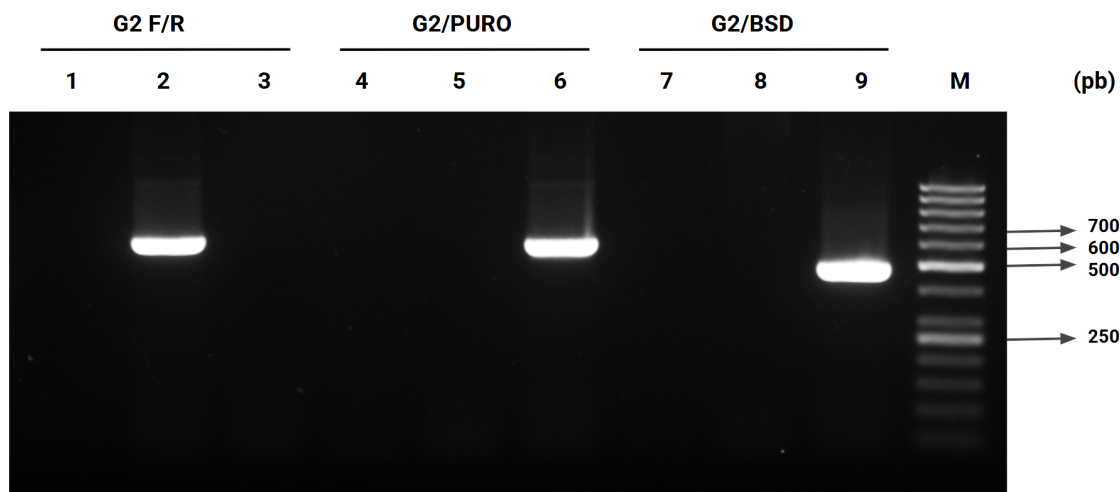


Figura 19. Evaluación por PCR y análisis por electroforesis en gel de agarosa de la sustitución de G2. En la línea control *pLew* se obtuvo un amplicón con los cebadores G2F/G2R (carril 2), mientras que no se detectaron productos con combinaciones específicas para genes de resistencia PURO ni BSD (carriles 5 y 8 respectivamente). En la línea editada G2 vemos amplificación con G2F/PUROR (carril 6) y G2F/BSDR (carril 9), sin amplificación del gen endógeno G2 (carril 3). No se observaron productos en los controles sin ADN molde (NTC, carriles 1, 4 y 7). M: marcador de peso molecular GeneRuler 50 bp DNA Ladder.

Estos resultados demuestran que ambos alelos del gen G2 fueron sustituidos exitosamente por los genes de resistencia a través de recombinación homóloga, lo que valida la integración dirigida del ADN donador y confirma la eliminación del gen G2. De este modo, se obtuvo una línea *knockout* para G2 (G2 $-/-$).

3.2. Clonación mediante deposición de células individuales

Para obtener una población clonal editada, se realizó una clonación por deposición de células individuales en placas de 48 pocillos. Para eso, se obtuvo un cultivo de epimastigotas que se analizó por citometría de flujo registrando una cantidad suficiente de eventos para delimitar la población correspondiente a parásitos individuales, de manera de asegurar la deposición de una sola célula por pocillo. Se monitoreó el crecimiento de los clones mediante microscopio y aquellos que alcanzaron una densidad suficiente fueron subclonados a frascos con 3 mL con LIT 10% SFB.

Si bien logramos obtener clones viables de las líneas G6 y G9-stop, al analizar a los clones aislados por PCR, en ninguno se obtuvieron amplificaciones indicativas de integraciones exitosas del donador. Esto sugiere que, aunque la edición ocurrió en la población transfectada, como fue verificado por PCR (**Figura 18**), la frecuencia de transfección o integración fue baja, por lo que no se pudieron recuperar clones editados.

Por otro lado, a partir de la línea G2 $-/-$ obtuvimos un total de 30 clones viables. Una vez crecidos se obtuvieron los ADN genómicos y se analizaron por PCR, mostrando amplificación de ambos genes de resistencia. Por lo tanto, además de obtener y respaldar a la población transfectada parental, logramos aislar parásitos individuales editados, generando líneas clonales homogéneas de epimastigotas *knockout* para G2 (**Figura 20**).

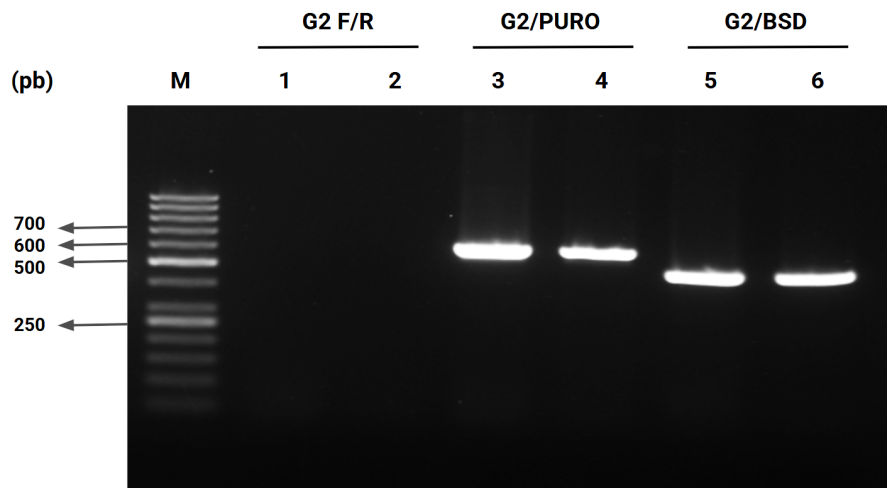


Figura 20. Evaluación por PCR de clones obtenidos a partir de la línea editada G2. Amplificación por PCR de los clones 12 y 20. Se empleó un cebador Forward para G2 y cebadores Reversos específicos para G2 (G2R) y para los genes BSD (BSDR) y PURO (PUROR). En los clones 12 y 20 se observa la presencia de bandas del tamaño esperado que indican la integración de los genes de resistencia a puromicina (carriles 3 y 4) y blasticidina (carriles 5 y 6) y la ausencia de amplificación del gen endógeno G2 (carriles 1 y 2); M: marcador de peso molecular GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder.

3.3. Cuantificación de la expresión de G2

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la estrategia de reemplazo génico y confirmar la eliminación del grupo G2, se realizó una cuantificación de la expresión del gen G2 mediante RT-qPCR en las líneas *knockout* (G2 $-/-$) y la línea control pLew. Adicionalmente se incluyó en el análisis la línea resultante de la primera ronda de transfección (resistente a puromicina), que denominaremos *hemiknockout* (G2 $+/-$). Para ello, se extrajo ARN total de epimastigotas de las tres líneas mencionadas, a partir de dos réplicas biológicas independientes (A y B). Cuantificamos su concentración y pureza por espectrofotometría de gota (NanoDrop™) (**Tabla 7**), y se realizó un tratamiento con DNAsa para eliminar remanentes de ADN genómico.

Tabla 7. Concentración y pureza del ARN total extraído		
Línea	Concentración (ng/μL)	Pureza (Abs 260/280)
pLew A	1080.602	2.202
G2 +/- A	650.479	2.088

G2 -/- A	856.738	2.106
pLew B	1172.600	2.205
G2 +/- B	1044.315	2.113
G2 -/- B	863.505	2.093

Posteriormente, se procedió a la síntesis de cDNA utilizando oligo(dT) y retrotranscriptasa, a partir de la misma cantidad de ARN total en cada muestra, incluyendo controles sin retrotranscriptasa para evaluar la eficacia del tratamiento con DNAsa. La calidad e integridad del cDNA obtenido fue evaluada por mediciones espectrofotométricas, y mediante PCR verificando la amplificación del gen constitutivo TIM (triosa fosfato isomerasa). Se descartó la presencia de contaminación con ADN genómico mediante la amplificación de una región genómica que abarca dos genes contiguos m-TXNPx y Ciclofilina, cuya ausencia de amplificación evidencia la ausencia de ADN genómico.

El siguiente paso en el análisis por RT-qPCR consistió en la amplificación del cDNA empleando cebadores específicos para el gen de interés G2 y para el gen constitutivo TIM, utilizado como control endógeno para la normalización de los datos.

Con el fin de validar la especificidad de las reacciones, se analizaron las curvas de amplificación y de disociación (**Figura 21**). Se observó un único pico definido en la curva de disociación, correspondiente a un único producto de amplificación (T_m específica), lo que confirma la ausencia de amplificaciones inespecíficas o formación de dímeros de cebadores. Asimismo, la amplificación del gen constitutivo TIM fue consistente en todas las líneas, con valores de Ct de 20,7 y 19,3 en pLew, 20,7 y 19,0 en G2 -/-, y 19,0 en G2 +/-, lo que indica una adecuada calidad del cDNA y de las condiciones experimentales. La baja variabilidad entre réplicas técnicas respalda la reproducibilidad de los datos obtenidos.

En la línea control pLew se detectó la expresión de G2, con valores promedio de Ct de 23,7 y 22,7 en la réplicas biológicas, mientras que en la línea *knockout* no se registró amplificación de G2 en ninguna de las réplicas biológicas (Ct: *undetermined*). Esta falta de amplificación demuestra la ausencia de transcritos de G2 en la línea *knockout*.

Por su parte, en la línea G2 +/-, se detectó amplificación del transcripto G2, con un valor promedio de Ct de 23. El análisis de expresión relativa mediante el método $\Delta\Delta Ct$ indicó una disminución del 38,4% en la cantidad de transcritos de G2 en comparación con la línea control pLew. Estos resultados se resumen en la **Figura 22**, que evidencia la reducción parcial de la expresión de G2 a nivel de ARNm en la línea *hemiknockout*, y su ausencia total en la línea *knockout*.

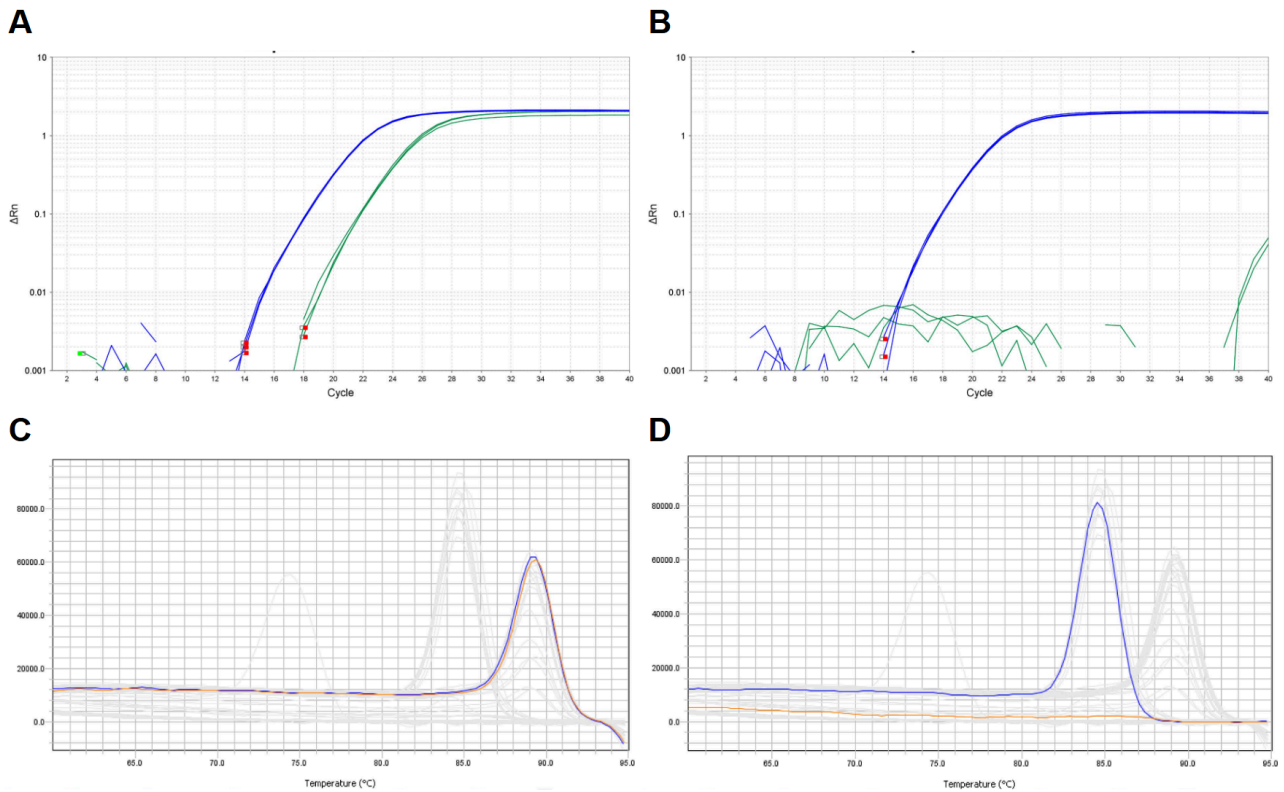


Figura 21. Curvas de amplificación y disociación de TIM y G2. Cuvas de amplificación de los genes TIM (azul) y G2 (verde). El cuadro (A) corresponde a la línea pLew y el (B) a la línea G2 knockout. (C) Curva de disociación correspondiente al gen TIM en la línea pLew (azul) y G2 knockout (naranja). (D) Curva de disociación del gen G2 en la línea plew (azul).

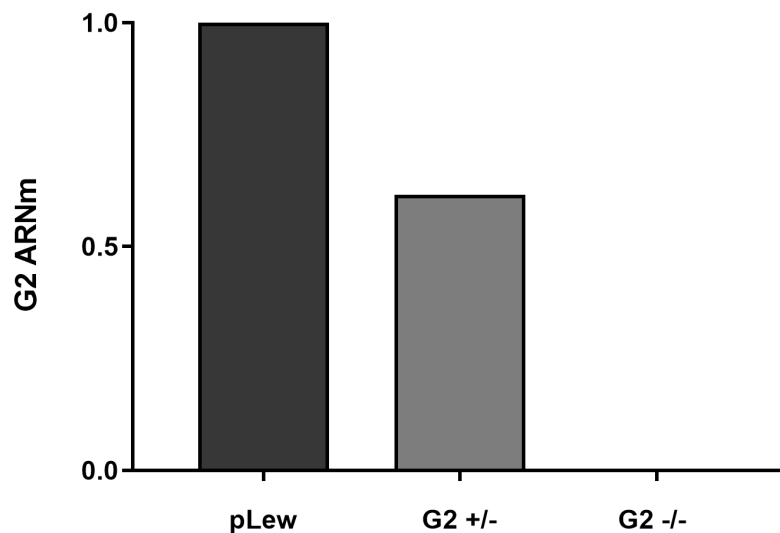


Figura 22. Expresión relativa de G2 mediante RT-qPCR. Se utilizó la línea pLew como referencia (valor arbitrario=1) para el cálculo del fold change por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), normalizando al gen TIM. Los valores se presentan como el promedio del triplicado técnico de ambas réplicas biológicas independientes.

4. Evaluación funcional de la línea deficiente en G2

4.1 Análisis de la proliferación de epimastigotas

Con el objetivo de evaluar si la edición de G2 afecta la capacidad proliferativa de los epimastigotas, se realizó un seguimiento del crecimiento *in vitro* en placas de 96 pocillos. Se sembró la misma cantidad de parásitos por pocillo y se realizaron mediciones de densidad óptica a 630 nm (DO630) durante diez días. Las líneas comparadas incluyeron la línea *knockout* y el control pLew, junto con un blanco negativo (medio LIT sin parásitos). La relación entre absorbancia y cantidad de parásitos se estimó mediante la ecuación de calibración: $y = 0,0035x + 0,1372$, donde “y” representa la absorbancia a 630 nm y “x” la cantidad de parásitos (millones/mL).

Ambas líneas mostraron una cinética de crecimiento comparable, con una fase exponencial definida hasta el día 5 y una posterior estabilización, indicando el ingreso a la fase estacionaria del crecimiento (**Figura 23**). No se detectaron diferencias significativas en los valores de DO. Estos resultados sugieren que la ausencia de expresión de G2 no compromete la viabilidad ni la capacidad de división de los epimastigotas en condiciones de cultivo axénico.

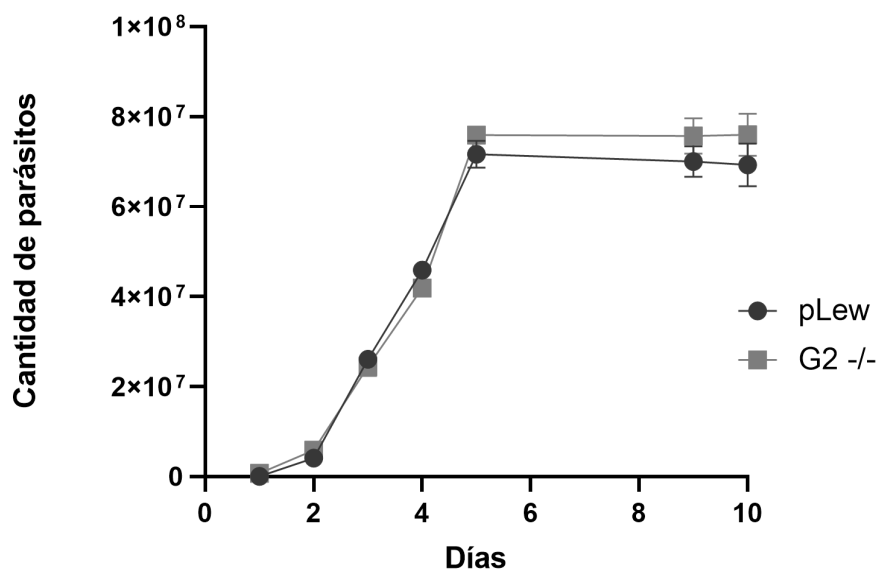


Figura 23. Curva de crecimiento de epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Dm28c). Se comparó la cinética de crecimiento de la línea *knockout* G2 -/- y la línea control pLew. Los cultivos se ajustaron a una concentración inicial de 5×10^6 parásitos/mL y se sembraron 100 μ L por pocillo en placas de 96 pocillos, con seis réplicas por condición. La densidad celular se estimó de forma indirecta mediante la medición de la absorbancia a 630 nm durante 10 días, utilizando un lector de placas ELx800 (BioTek Instruments). La curva muestra la cinética de crecimiento comparativa de cada línea a lo largo del tiempo. Los valores se expresan como media \pm SD.

4.2 Ensayos de infección *in vitro*

Para evaluar el efecto funcional de G2 en la interacción parásito-hospedero, nos planteamos comparar la capacidad infectiva de la línea *knockout* respecto a la línea control pLew en ensayos de infección *in vitro*. Para ello, en primer lugar llevamos a cabo una metaciclologénesis *in vitro* para ambas líneas, siguiendo el protocolo descrito por Contreras (1985). Los epimastigotas en fase exponencial tardía fueron incubados en un medio TAU pobre en nutrientes para inducir estrés nutricional, y luego en medio enriquecido (con glucosa, prolina, ácido glutámico y ácido aspártico), promoviendo así su diferenciación a tripomastigotas metacíclicos. Éstos fueron observados en el cultivo 72-96 horas posteriores a la inducción del estrés nutricional. La eficacia de la diferenciación fue evaluada por microscopía óptica, observando la morfología y motilidad característica de las formas infectivas.

Los tripomastigotas metacíclicos fueron utilizados para generar infecciones en células Vero y obtener tripomastigotas derivados de estas células, que fueron recolectados a los cuatro días post-infección. Los tripomastigotas derivados de células se emplearon para evaluar la infectividad de la línea G2 *-/-* y pLew en ensayos de infección *in vitro* sobre monocapas de células Vero.

En primer lugar, se evaluaron procesos correspondientes a etapas tempranas de la infección, específicamente la invasión celular y la replicación intracelular. Para ello, determinamos la capacidad de invasión, calculada como el porcentaje de células infectadas respecto al número total de células, y la capacidad replicativa, que se estimó cuantificando el número de amastigotas intracelulares a las 48 horas post-infección. Para la detección de la infección mediante inmunofluorescencia indirecta, se empleó tinción con DAPI para visualizar los núcleos celulares y un anticuerpo primario anti-CPX, que reconoce específicamente a la triparredoxina peroxidasa citosólica de *T. cruzi*, permitiendo identificar los amastigotas intracelulares (**Figura 24**).

En este ensayo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número promedio de amastigotas por célula infectada entre la línea editada y el control para los tiempos estudiados (**Figura 25A**). Esto sugiere que la delección de G2 no afecta la supervivencia ni la replicación intracelular del parásito en etapas tempranas de la infección. No obstante, la línea G2 *-/-* mostró una reducción significativa del 23% en la cantidad de células infectadas en comparación con el control pLew (**Figura 25B**), lo que indica un posible efecto de G2 en la capacidad invasiva del parásito.

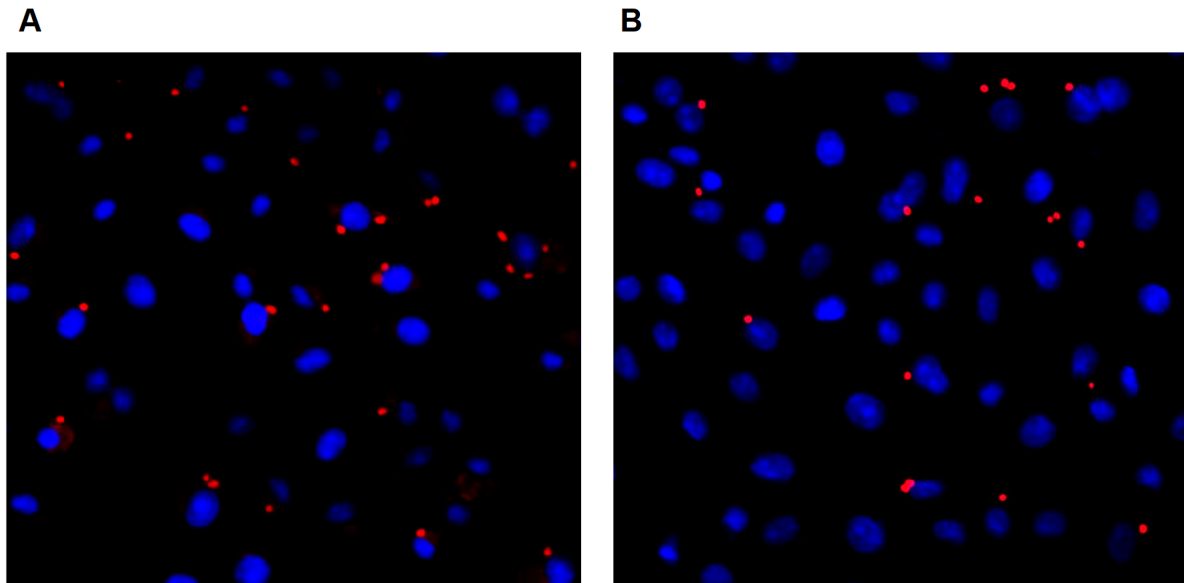


Figura 24. Micrografía de inmunofluorescencia indirecta de células Vero a 48 horas post-infección. Los amastigotas intracelulares se visualizan en rojo (anticuerpo α -CPX) y los núcleos celulares en azul (DAPI). Se muestran en (A) células infectadas con la línea control pLew y en (B) con la línea editada G2 -/-.

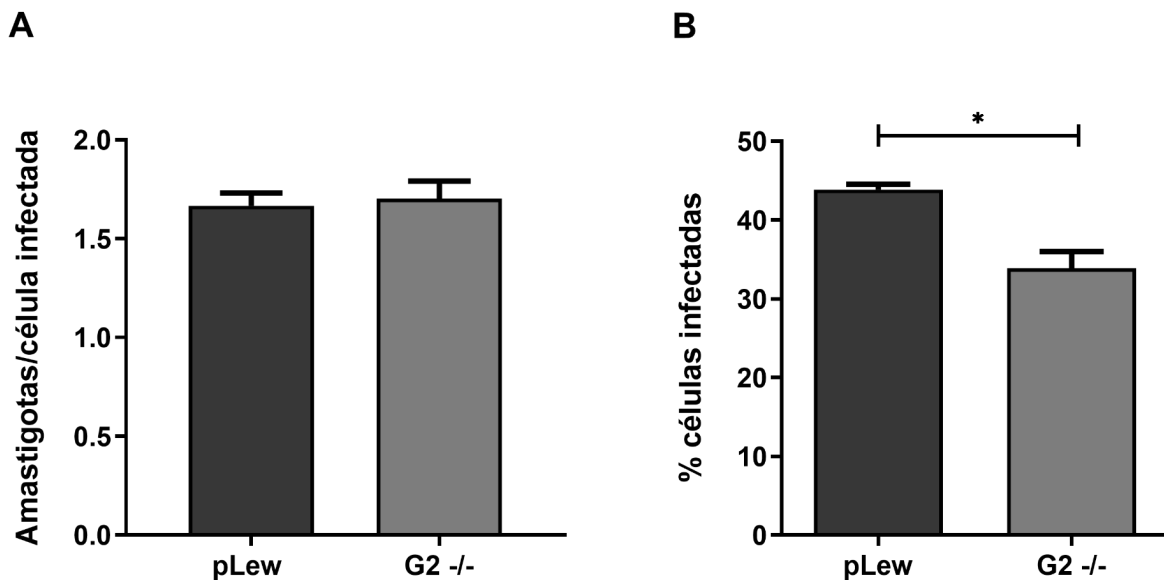
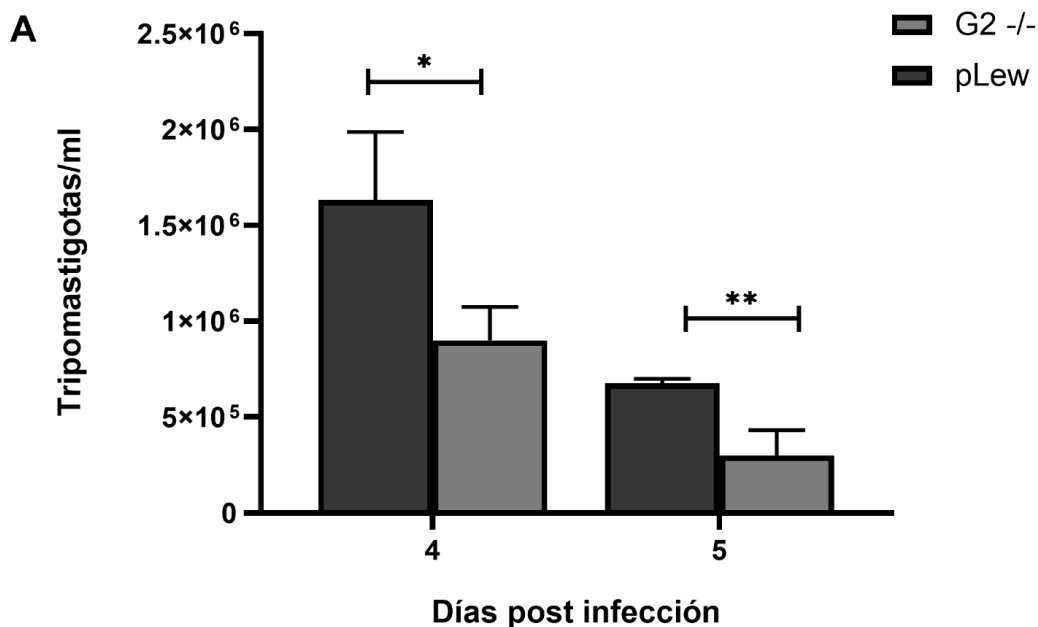


Figura 25. Ensayos de infección in vitro a 48 horas post-infección. Comparación entre la línea control pLew y la línea editada G2 -/-. Se analizaron en promedio 1049 células por réplica, evaluando 12 campos al azar por condición. Se utilizó el software ImageJ 1.54f para cuantificar los parámetros de interés. (A) Número promedio de amastigotas por célula infectada y (B) porcentaje de células infectadas. Los valores se expresan como media \pm SD. El * indica un valor de p menor a 0.05 utilizando el test de Student.

Con el objetivo de evaluar el proceso de infección celular completo, y para investigar si G2 podría estar implicado en etapas posteriores del ciclo infectivo, complementamos los ensayos funcionales, evaluando la cantidad de tripomastigotas presentes en el sobrenadante de células infectadas. Estos tripomastigotas emergen tras la lisis de células infectadas en tiempos tardíos de la infección.

Para ello realizamos dos experimentos en los que se infectaron monocapas de células Vero empleando dos relaciones parásito-célula (10:1 y 3:1) con distintos tiempos de incubación con los parásitos (3 y 20 horas, respectivamente). A las 96 y 120 horas post-infección, se recolectaron los sobrenadantes y los tripomastigotas se fijaron en formaldehído al 4%. El conteo de parásitos fue realizado bajo el microscopio en una cámara de conteo celular.

Los resultados de ambos ensayos evidenciaron una disminución significativa del 40-57% en el número de tripomastigotas liberados por la línea editada en comparación con el control pLew (**Figura 26**). Esta diferencia fue consistente en ambos experimentos y entre las réplicas técnicas. En conjunto, estos resultados sugieren que la delección de G2 podría tener un efecto relevante en la eficiencia de invasión y en la producción o liberación de tripomastigotas al sobrenadante.



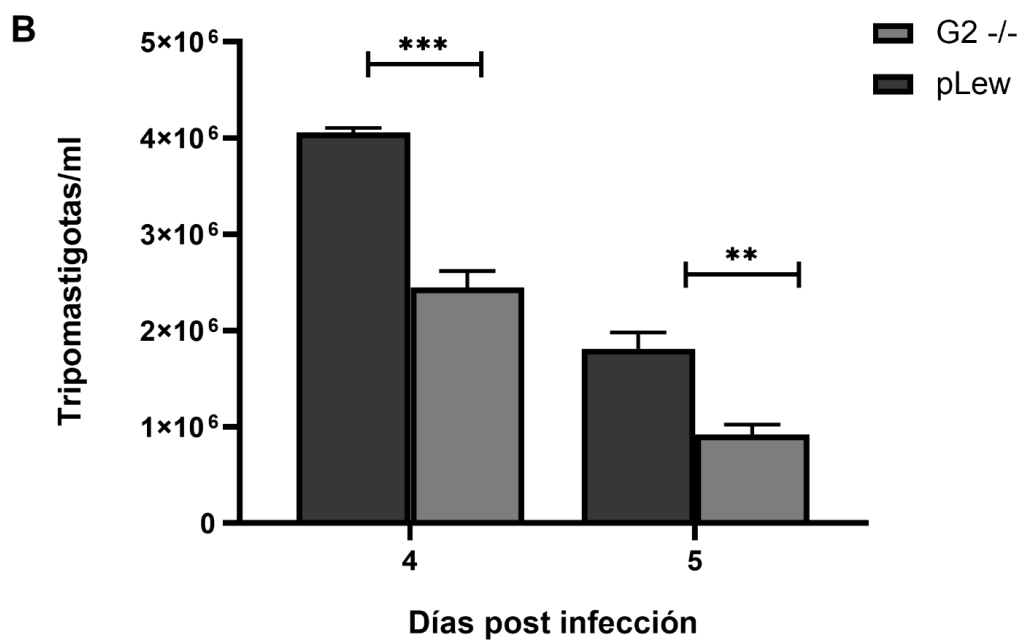


Figura 26. Cuantificación de tripomastigotas liberados en el sobrenadante de cultivos infectados. Se evaluó la cantidad de tripomastigotas en el sobrenadante de células Vero infectadas con la línea control pLew y la línea editada G2 -/- a distintos tiempos post-infección. Se presentan los datos de dos experimentos independientes: en el ensayo A se utilizó una relación parásito:célula de 10:1 con un tiempo de incubación de 3 horas, mientras que en el ensayo B se utilizó una relación 3:1 con incubación de 20 horas. Los datos se expresan como media \pm SD. Se consideró: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (test de Student).

Discusión

Disrupción génica de los grupos G6 y G9 de GP63

Este trabajo permitió poner a prueba una estrategia de edición génica para interrumpir de manera simultánea varios miembros de la familia multigénica GP63, mediante la inserción de codones stop en los genes blanco utilizando un ADN donador. Esta elección se sustenta en estudios previos que demuestran que, en *T. cruzi*, la eficiencia de edición mediada por CRISPR-Cas9 es significativamente mayor en presencia de un ADN donador que favorezca la recombinación homóloga (Chiurillo & Lander, 2021). Particularmente, intentamos replicar la estrategia diseñada por Burle-Caldas (2022), con la cual reportaron una exitosa disrupción de varios miembros de la familia de las trans-sialidasas. De todos modos, este enfoque todavía enfrenta ciertos desafíos relacionados con la eficiencia de edición, de transfección y la plasticidad genómica de este organismo.

La aplicación del sistema CRISPR-Cas9 representó un punto de inflexión metodológico, y ha sido particularmente valioso en organismos que históricamente presentaron dificultades para su edición génica, como *Trypanosoma cruzi*. Su implementación ha facilitado la modificación simultánea de genes, incluyendo miembros de familias multigénicas, permitiendo un avance significativo en estudios funcionales, que antes eran muy limitados por la baja eficiencia de los métodos de edición disponibles (Lander et al., 2016; Peng & Tarleton, 2015).

Nuestros resultados preliminares demuestran la viabilidad técnica de la aproximación, pero a la vez evidencian la complejidad de aislar líneas clonales editadas de forma estable sin selección con antibióticos. Esta dificultad podría atribuirse a la baja proporción de parásitos efectivamente editados dentro la población total y a posibles limitaciones en la eficiencia de transfección o recombinación homóloga. Como perspectiva, se propone optimizar factores clave para maximizar la eficiencia de edición, incluyendo mejoras en los protocolos de transfección, ajustes en la concentración y pureza de los sgRNAs, en la extensión de los brazos de homología, y la implementación de condiciones de cultivo que favorezcan la expansión de clones editados.

La optimización de estas variables podría aumentar significativamente la probabilidad de recuperar clones editados, aportando una herramienta valiosa para futuros estudios funcionales que profundicen en el papel de GP63, así como una base para el diseño de estrategias de edición mediante CRISPR-Cas9 dirigidas a familias génicas en *T. cruzi*.

Sustitución dirigida del grupo G2 de GP63

Nuestra investigación se centró en caracterizar funcionalmente al grupo G2 de la familia de metaloproteasas GP63 de *Trypanosoma cruzi*. Este grupo, constituido por las copias haplotípicas C4B63_271g8 y C4B63_43g199 del genoma de la cepa Dm28c, fue seleccionado por su elevada expresión de transcritos en el estadio tripomastigota (forma infectiva del parásito para el hospedero vertebrado), lo que sugiere un posible rol en etapas críticas del ciclo infectivo relacionadas con la interacción parásito-hospedero. Además, la presencia de péptido señal y la ausencia de señal predicha de anclaje GPI sugieren que esta proteína puede ser secretada, lo que podría indicar un efecto en la modulación del sistema inmune del hospedero, tal como se ha reportado para otras proteínas secretadas como la triparredoxina peroxidasa citosólica (Chiribao et al., 2024). Análisis proteómicos preliminares que hemos realizado en nuestro laboratorio corroboran esta hipótesis, identificando la presencia de esta proteína en el sobrenadante de infección.

Esta familia multigénica altamente diversificada se encuentra en los tres tripanosomátidos patógenos humanos. En *Leishmania*, GP63 ha sido extensamente estudiada y es reconocida como un factor de virulencia esencial (Olivier et al., 2012). En contraposición, su caracterización en *T. cruzi* ha sido escasa, a pesar de que esta familia génica se encuentra expandida en su genoma (Berná et al., 2025). Nuestra investigación contribuye a reducir esta brecha al explorar la función de GP63 en la infectividad mediante la generación de líneas *knockout* para estos genes.

La estrategia de edición empleada para el grupo G2 se basó en el reemplazo de ambos alelos por dos genes de resistencia a dos antibióticos diferentes (puromicina y blasticidina), mediante recombinación homóloga utilizando el sistema CRISPR-Cas9. Desde los primeros trabajos que adaptaron la metodología CRISPR-Cas9 a *T. cruzi* (Lander et al., 2015; Peng et al., 2015), ésta se ha consolidado como una herramienta indispensable para conducir estudios funcionales, permitiendo una edición específica y eficiente.

La obtención de líneas doblemente resistentes, en las que se verificó por PCR la correcta integración de ambos marcadores de resistencia en el *locus* blanco, así como la ausencia del gen endógeno, confirman que fue posible generar mutantes deficientes en G2 mediante recombinación homóloga dirigida. Posteriormente, la validación de la edición se llevó a cabo mediante RT-qPCR, donde se observó una reducción parcial en los niveles de ARNm de G2 en la línea *hemiknockout*, consistente con la sustitución de un solo alelo. Por otro lado, la ausencia total de amplificación del transcripto G2 en la línea *knockout* sugiere una pérdida de expresión completa, consistente con la eliminación de ambos alelos del gen. Estos hallazgos indican que la edición tuvo un impacto directo sobre la transcripción del gen blanco y evidencian la eficacia de la estrategia CRISPR-Cas9 aplicada.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que fue posible generar líneas *knockout* estables de *T. cruzi*, con pérdida completa de la expresión de G2. Esta validación a nivel genómico y transcripcional convierte a la línea G2 *-/-* en una herramienta experimental robusta para el estudio funcional de este grupo de la familia GP63, permitiendo avanzar en la comprensión de su rol en el ciclo infectivo del parásito.

Impacto de la delección de G2 sobre la biología del parásito

La evaluación del crecimiento *in vitro* de las líneas obtenidas mostró que la edición de G2 no afecta la viabilidad ni la capacidad replicativa de los epimastigotas en condiciones axénicas. Tampoco se observaron, en ensayos de infección *in vitro*, diferencias en la cantidad de amastigotas por célula infectada a las 48 horas post-infección, lo que indica que no afecta a la replicación de los amastigotas bajo las condiciones estudiadas. Estos resultados sugieren que G2 no participa en la capacidad replicativa de las formas epimastigotas ni amastigotas, lo cual es consistente con su patrón de expresión predominante en tripomastigotas.

Por otro lado, en los ensayos de infectividad realizados en este trabajo, se evidenció una disminución en el número de células infectadas cuando se empleó la línea G2 *knockout*, lo que indica una posible alteración en la capacidad de invasión, y sugiere que G2 podría estar involucrado en la entrada de *T. cruzi* a las células hospederas. Previamente se ha demostrado que las proteasas de este parásito cumplen funciones relevantes en diferentes etapas del ciclo infectivo, incluida la invasión, como se ha descrito para algunas proteasas secretadas como cruzipaina y oligopeptidasa B (De Souza et al., 2010; Goldenberg & Ávila, 2011). En este contexto, resulta plausible que G2, una potencial proteasa secretada, cumpla un rol en la invasividad; hipótesis que deberá comprobarse mediante ensayos de invasión cuantificando el número de tripomastigotas que ingresan a las células en tiempos cortos de interacción parásito-célula.

En línea con esta interpretación, estudios clásicos identificaron en *T. cruzi* una proteína de superficie de 60 kDa denominada Penetrina, capaz de unirse selectivamente a componentes de la matriz extracelular, como heparina, heparán sulfato y colágeno, y de promover tanto la adhesión como la internalización de tripomastigotas en células hospederas (Ortega-Barria & Pereira, 1991). A pesar de estos resultados prometedores, la identidad molecular de esta proteína aún no ha sido dilucidada. Algunos autores plantearon que Penetrina podría corresponder a GP63 (Walker et al., 2014), debido a su tamaño y a su participación en la invasión celular (Cuevas et al., 2003; Kulkarni et al., 2009). De este modo, tanto la evidencia experimental obtenida como los antecedentes mencionados refuerzan la hipótesis de que miembros de la familia GP63, como G2, podrían participar en el proceso de invasión de *T. cruzi* a las células hospederas.

En los ensayos de infección *in vitro* a tiempos mayores (96 y 120 horas) la línea editada G2 -/- mostró una disminución significativa en la cantidad de tripomastigotas liberados al sobrenadante, en forma reproducible y sostenida. La reducción en la cantidad de tripomastigotas podría explicarse, por un lado, por la menor proporción de células infectadas en dicha condición. Otra posibilidad, podría ser que exista una interferencia en los pasos finales del desarrollo intracelular y del egreso del parásito, lo que también conduce a una disminución en el número de tripomastigotas recuperados del sobrenadante de células infectadas, tal como fue reportado por Burle-Caldas et al. (2022) al eliminar genes de la familia trans-sialidasa. En este sentido, ha sido evidenciado que las proteasas de *T. cruzi* participan tanto en su diferenciación como en el egreso, ya que el uso de inhibidores específicos de proteasas o metaloproteasas interfiere en el desarrollo intracelular del parásito y en su salida de las células hospederas (Goldenberg & Ávila, 2011; Rivadeneira Villacís, 2016).

En particular, el egreso del parásito de la célula infectada parece estar mediado por mecanismos que involucran enzimas secretadas (Burleigh & Andrews, 1995). Si bien los desencadenantes moleculares de la ruptura de la célula hospederas y la liberación de los tripomastigotas aún no han sido completamente dilucidados, se ha planteado que las proteasas del parásito desempeñan un papel central en este proceso, debilitando las barreras estructurales que retienen al parásito (Costales & Rowland, 2007). Ferreira et al. (2021) demostraron que durante el ciclo intracelular, los filamentos de actina son progresivamente degradados debido a la acción de proteasas parasitarias, y que esta pérdida de actina filamentosa es un paso esencial en el egreso. Una vez debilitado el citoesqueleto, la torsión mecánica ejercida por la motilidad de los tripomastigotas provocaría la ruptura abrupta de la membrana y la liberación masiva de los parásitos (Ferreira et al., 2021). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la actividad proteolítica de *T. cruzi* es un factor determinante para asegurar la propagación de la infección durante el ciclo lítico.

En este contexto, proponemos que G2 podría estar involucrado no solo en la invasión, sino también en otras etapas de la interacción parásito-célula, facilitando procesos como la diferenciación amastigota-tripomastigota y el egreso desde las células hospederas. En el estudio conducido por Burle-Caldas (2022), se propuso que las trans-sialidasas pueden cumplir roles tanto en la invasión como en el egreso, actuando mediante dominios funcionales diferenciados, como un dominio de unión a la superficie celular y un dominio con actividad enzimática, modelo que podría aplicarse también a GP63.

Considerando que la línea editada presenta un fenotipo observable en los ensayos de infectividad realizados sobre monocapas de células Vero (en ausencia del sistema inmunológico), se propone que G2 podría ejercer un efecto directo sobre las células hospederas, modificando su susceptibilidad a la infección. En *Leishmania*, se ha demostrado que las metaloproteasas GP63 presentan múltiples funciones en el ciclo infectivo que van más

allá de la evasión del sistema inmune. Estas proteasas son capaces de interactuar de forma directa con proteínas del hospedero, afectando numerosas vías de señalización celular como JAK o MAPK (Isnard et al., 2012; Olivier et al., 2012). Estos antecedentes respaldan la hipótesis de una interacción directa entre GP63 de *T. cruzi* y componentes específicos de las células hospederas, lo que abriría nuevas perspectivas para explorar en profundidad sus posibles blancos moleculares y mecanismos de acción.

En la familia GP63 de *T. cruzi*, se ha demostrado actividad metaloproteasa de algunos miembros y expresión diferencial en estadios infectivos (Cuevas et al., 2003). En este sentido, la presencia de los residuos conservados en el sitio activo y su sobreexpresión en tripomastigotas, sugieren que G2 puede ser un miembro catalíticamente activo y con funciones relevantes en el estadio infectivo. Además, las proteínas del grupo G2 presentan péptidos señal y carecen de señales de anclaje GPI, lo que sugiere que podrían ser secretadas.

En *Leishmania*, la proteína GP63 secretada es capaz de ingresar al citoplasma de células infectadas, donde altera vías de transducción de señales, y al núcleo celular, donde cataliza el clivaje de factores de transcripción, interfiriendo en la respuesta inmune del hospedero (Olivier et al., 2012). De forma análoga a lo demostrado en *Leishmania*, la acción de G2 en *T. cruzi* podría estar orientada también a la modulación de vías de señalización del hospedero, alterando la respuesta inmune o facilitando la supervivencia del parásito. Se ha documentado que, en la infección por *T. cruzi*, el desequilibrio de la respuesta inmunológica está asociado a la liberación de factores solubles con propiedades inmunosupresoras (Van Overtvelt, 1999). En este contexto, un desafío futuro será determinar si G2 forma parte del secretoma del parásito y, en tal caso, evaluar su contribución como potencial factor inmunomodulador.

Limitaciones del estudio y perspectivas

Resulta fundamental ampliar el número de réplicas biológicas independientes en los ensayos de infección, ya que esto permitirá incrementar la robustez y reproducibilidad de los datos obtenidos. Esta necesidad se debe a diversas limitaciones técnicas que pueden influir en la variabilidad experimental, tales como la eficiencia de plaqueo, el recuento de células y parásitos al microscopio, así como las diferencias en el establecimiento de la infección entre distintos ensayos. A pesar de estas posibles fuentes de variación, la tendencia observada es consistente: la delección del grupo G2 conduce a una reducción en la capacidad infectiva de los parásitos.

Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con la bibliografía disponible, respaldan la hipótesis de que las metaloproteasas GP63 cumplen funciones relevantes en el ciclo infectivo de *T. cruzi*. El presente estudio constituye un primer paso hacia la caracterización funcional de G2 de GP63 en *T. cruzi*. Para confirmar la especificidad del fenotipo observado en las

líneas *knockout*, será fundamental llevar a cabo ensayos de complementación funcional, mediante la reintroducción del gen G2. Este enfoque permitirá evaluar si la disminución en la capacidad infectiva se debe a la delección de G2 o puede estar alterada por efectos inespecíficos derivados de la edición genómica. De este modo, dicha estrategia brinda información esencial sobre la relación entre la presencia de G2 y el fenotipo observado, validando la interpretación de los resultados obtenidos.

Asimismo, nos proponemos generar líneas con G2 etiquetado con tags como HA, para estudiar la localización subcelular de G2 y evaluar su posible secreción e ingreso a las células hospederas, como ha sido reportado para GP63 en *Leishmania* (Olivier et al., 2012). Además, con la línea etiquetada se plantea conducir un análisis interactómico, lo que representaría una herramienta clave para identificar posibles blancos celulares de GP63, aportando información novedosa acerca de sus funciones.

Como un abordaje complementario, para evaluar la capacidad proteolítica de G2 mediante estudios de zimografía, se generarán líneas sobreexpresantes de versiones salvajes y mutantes del sitio activo de G2. A su vez, estas líneas podrían emplearse en futuros ensayos de infección *in vitro*, para continuar profundizando en el análisis del papel de G2 durante la infección. Para diferenciar la actividad proteasa de otros posibles efectos de la proteína, nos planteamos estudiar el efecto de la proteína G2 salvaje y mutante purificada, en la expresión de genes vinculados a vías de señalización en las células hospederas.

Con el objetivo de delimitar posibles regiones funcionales de GP63 responsables de la adhesión o invasión, se podrían realizar ensayos de incubación con fragmentos G2 recombinantes, replicando lo observado en trabajos anteriores. Por ejemplo, Kulkarni y colaboradores (2009) reportaron que la preincubación de mioblastos cardíacos con un fragmento C-terminal de GP63 condujo a una reducción significativa de la infección por *T. cruzi*, lo que sugiere que dicho dominio podría contener un sitio de unión específico para la superficie de la célula hospedera. Este tipo de ensayos de competencia permitiría evaluar el papel de regiones particulares de G2 en la interacción parásito-célula.

Finalmente, se podrían eventualmente evaluar las líneas *knockout* generadas como modelos de cepas atenuadas. Ensayos previos han demostrado que líneas con delecciones en genes de virulencia que mostraron una disminución de la infectividad *in vitro*, pueden resultar incapaces de establecer la enfermedad *in vivo*. A su vez, estas cepas atenuadas son capaces de inducir respuestas inmunes protectoras frente a infecciones por cepas virulentas (Burle-Caldas et al., 2022). Estos hallazgos abren la posibilidad de que mutantes en GP63 con fenotipos atenuados también puedan ser utilizados como plataformas vacunales experimentales.

Considerando el potencial rol de GP63 en la patogenicidad de *T. cruzi*, se plantea el desarrollo de inhibidores que bloqueen su actividad como posibles agentes quimioterápicos contra la enfermedad de Chagas (Camargo et al., 2025). Estudios previos han reportado que compuestos que *in silico* se unen al sitio activo de GP63, en ensayos *in vitro* presentan actividad anti-tripanicida contra amastigotas y tripomastigotas, sin toxicidad contra células de mamíferos (Camargo et al., 2025; Zuma et al., 2021).

La evidencia obtenida en este trabajo abre nuevas líneas de investigación sobre las proteasas GP63 y su posible evaluación como blanco terapéutico. Considerando que las proteínas secretadas son accesibles a la intervención farmacológica, y la posibilidad de desarrollar inhibidores específicos para estas proteasas, de demostrarse su secreción y efecto en la infectividad, G2 podría constituir una diana relevante. Una caracterización más profunda de su localización, actividad enzimática y rol durante la infección permitirá avanzar hacia ese objetivo.

Conclusiones

En conjunto, este estudio aporta evidencia novedosa y consistente sobre el rol de GP63 en *Trypanosoma cruzi*, una familia génica altamente diversificada y poco caracterizada en este parásito. A través del uso de herramientas de edición génica basadas en CRISPR-Cas9, se logró generar líneas mutantes deficientes en el gen del grupo G2, lo que nos permitió evaluar su impacto funcional en el proceso de infección.

Los resultados obtenidos muestran que la delección de este gen afecta la capacidad infectiva del parásito *in vitro*, lo cual sugiere que G2 estaría involucrada en etapas específicas de la interacción con las células hospederas, tales como la invasión, la diferenciación o el egreso celular. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que algunos miembros de GP63 podrían cumplir funciones clave durante la infección, tal como ha sido ampliamente demostrado en *Leishmania*.

A partir de los datos generados, se proponen nuevas líneas de investigación orientadas a profundizar en los mecanismos moleculares mediados por GP63, incluyendo estudios de localización subcelular, señalización, proteómica e interactómica, con particular interés en evaluar posibles blancos moleculares de esta proteína. Además, se abre la posibilidad de evaluar el potencial de estas proteínas como blancos terapéuticos o candidatos vacunales, en base a la disminución de la infectividad observada en la línea *knockout*.

En conjunto, este estudio sienta las bases para una caracterización más profunda de las funciones de la familia GP63 en *T. cruzi*, y contribuye al conocimiento general de los factores de virulencia implicados en la enfermedad de Chagas, con el objetivo de avanzar hacia el desarrollo de nuevas estrategias de intervención terapéutica.

Bibliografía

- Agaisse, H. (2007). An Adaptive Immune Response in *Drosophila*? *Cell Host & Microbe*, *1*(2), 91-93. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.04.003>
- Aguilar, H. M., Abad-Franch, F., Dias, J. C. P., Junqueira, A. C. V., & Coura, J. R. (2007). Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *102*(suppl 1), 47-56. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000098>
- Alvarez, V. E., Niemirowicz, G. T., & Cazzulo, J. J. (2012). The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1824*(1), 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.011>
- Amorín, B., & Pérez, L. (2016). Chagas congénito de segunda generación en Uruguay. Primer caso sintomático descrito en el país. *Archivos de Pediatría del Uruguay*.
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: Location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(10), 819-823. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>
- Andrade, Z. A. (1999). Immunopathology of Chagas disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *94*(suppl 1), 71-80. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700007>
- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Pablo Real, J., & Palma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, *156*, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, *364*(26), 2527-2534. <https://doi.org/10.1056/NEJMct1014204>
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas Disease in the United States: A Public Health Approach. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(1), e00023-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>
- 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., Chiribao, M. L., Pita, S., Alvarez-Valin, F., & Parodi-Talice, A. (2025). Exploring the genomic landscape of the GP63 family in *Trypanosoma cruzi*: Evolutionary dynamics and functional peculiarities. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *19*(3), e0012950. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012950>
- 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>
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renaud, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C. M., Arrowsmith, C., ... El-Sayed, N. M. (2005). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, *309*(5733), 416-422. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>
- Briceño-León, R. (2009). Chagas disease in the Americas: An ecohealth perspective. *Cadernos De Saude Publica*, *25*. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2009001300007>
- Briceño-León, R., & Méndez Galván, J. (2007). The social determinants of Chagas disease and the transformations of Latin America. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *102*, 109-112. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000095>
- Burle-Caldas, G. D. A., Dos Santos, N. S. A., De Castro, J. T., Mugge, F. L. B., Grazielle-Silva, V., Oliveira, A. E. R., Pereira, M. C. A., Reis-Cunha, J. L., Dos Santos, A. C., Gomes, D. A., Bartholomeu, D. C., Moretti, N. S., Schenkman, S., Gazzinelli, R. T., & Teixeira, S. M. R. (2022). Disruption of Active Trans-Sialidase Genes Impairs Egress from Mammalian Host Cells and Generates Highly Attenuated *Trypanosoma cruzi* Parasites. *mBio*, *13*(1), e03478-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03478-21>
- Burleigh, B. A., & Andrews, N. W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, *49*, 175-201.
- Buscaglia, C. A., Campo, V. A., Frasch, A. C. C., & Di Noia, J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: Host-dependent coat diversity. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(3), 229-236. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1351>
- Camargo, P. G., Da Silva, R. B., Zuma, A. A., Garden, S. J., Albuquerque, M. G., Rodrigues, C. R., & Da Silva Lima, C. H. (2025). In silico evaluation of

- N-aryl-1,10-phenanthroline-2-amines as potential inhibitors of *T. cruzi* GP63 zinc-metalloprotease by docking and molecular dynamics simulations. *Scientific Reports*, 15(1), 6036. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90088-y>
- Carrasco, H. J., Torrellas, A., García, C., Segovia, M., & Feliciangeli, M. D. (2005). Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *International Journal for Parasitology*, 35(13), 1379-1384. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.05.003>
- Castro Neto, A. L., Brito, A. N. A. L. M., Rezende, A. M., Magalhães, F. B., & De Melo Neto, O. P. (2019). In silico characterization of multiple genes encoding the GP63 virulence protein from *Leishmania braziliensis*: Identification of sources of variation and putative roles in immune evasion. *BMC Genomics*, 20(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5465-z>
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), 159-218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>
- Chávez, S., Eastman, G., Smircich, P., Becco, L. L., Oliveira-Rizzo, C., Fort, R., Potenza, M., Garat, B., Sotelo-Silveira, J. R., & Duhagon, M. A. (2017). Transcriptome-wide analysis of the *Trypanosoma cruzi* proliferative cycle identifies the periodically expressed mRNAs and their multiple levels of control. *PLOS ONE*, 12(11), e0188441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188441>
- Chiribao, M. L., Díaz-Viraqué, F., Libisch, M. G., Batthyány, C., Cunha, N., De Souza, W., Parodi-Talice, A., & Robello, C. (2024). Paracrine Signaling Mediated by the Cytosolic Tryparedoxin Peroxidase of *Trypanosoma cruzi*. *Pathogens*, 13(1), 67. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010067>
- Chiurillo, M. A., & Lander, N. (2021). The long and winding road of reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *Microbial Cell*, 8(9), 203-207. <https://doi.org/10.15698/mic2021.09.758>
- Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M., & Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16(3), 315-327. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90073-8)

- Costa, F. C., Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Calderano, S. G., Lewis, M. D., Olmo, F., Beneke, T., Gluenz, E., Sunter, J., Dean, S., Kelly, J. M., & Taylor, M. C. (2018). Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *12*(4), e0006388. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006388>
- Costales, J., & Rowland, E. C. (2007). A ROLE FOR PROTEASE ACTIVITY AND HOST-CELL PERMEABILITY DURING THE PROCESS OF TRYPANOSOMA CRUZI EGRESS FROM INFECTED CELLS. *Journal of Parasitology*, *93*(6), 1350-1359. <https://doi.org/10.1645/GE-1074.1>
- Coura, J. R., & Castro, S. L. D. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *97*(1), 3-24. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001>
- Cuevas, I. C., Cazzulo, J. J., & Sánchez, D. O. (2003). gp63 Homologues in *Trypanosoma cruzi*: Surface Antigens with Metalloprotease Activity and a Possible Role in Host Cell Infection. *Infection and Immunity*, *71*(10), 5739-5749. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5739-5749.2003>
- De Oliveira, R. B., Troncon, L. E. A., Dantas, R. O., & Meneghelli, U. G. (1998). *Gastrointestinal Manifestations of Chagas' Disease*. Official journal of the American College of Gastroenterology, ACG, *93*(6), 884-889.
- 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., & Barrias, E. S. (2020). May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective? *Acta Tropica*, *212*, 105688. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105688>
- De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, *2010*, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- Dias, J. C. P. (1995). [Natural history of Chagas disease]. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, *65*(4), 359-366.

- Díaz-Viraqué, F., Chiribao, M. L., Libisch, M. G., & Robello, C. (2023). Genome-wide chromatin interaction map for *Trypanosoma cruzi*. *Nature Microbiology*, *8*(11), 2103-2114. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01483-y>
- Díaz-Viraqué, F., Pita, S., Greif, G., De Souza, R. D. C. M., Iraola, G., & Robello, C. (2019). Nanopore Sequencing Significantly Improves Genome Assembly of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*. *Genome Biology and Evolution*, *11*(7), 1952-1957. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz129>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Wortley, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Åslund, L., Attipoe, P., ... Andersson, B. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, *309*(5733), 409-415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- Espinosa, R., Carrasco, H. A., Belandria, F., Fuenmayor, A. M., Molina, C., González, R., & Martínez, O. (1985). Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: Prognosis after one decade (1973–1983). *International Journal of Cardiology*, *8*(1), 45-56. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(85\)90262-1](https://doi.org/10.1016/0167-5273(85)90262-1)
- Ferreira, E. R., Bonfim-Melo, A., Burleigh, B. A., Costales, J. A., Tyler, K. M., & Mortara, R. A. (2021). Parasite-Mediated Remodeling of the Host Microfilament Cytoskeleton Enables Rapid Egress of *Trypanosoma cruzi* following Membrane Rupture. *mBio*, *12*(3), e00988-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00988-21>
- Freire-de-Lima, L., Fonseca, L., Oeltmann, T., Mendonça-Previato, L., & Previato, J. (2015). The *trans*-sialidase, the major *Trypanosoma cruzi* virulence factor: Three decades of studies. *Glycobiology*, *25*(11), 1142-1149. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv057>
- Goldenberg, S., & Ávila, A. R. (2011). Aspects of *Trypanosoma cruzi* Stage Differentiation. En *Advances in Parasitology* (Vol. 75, pp. 285-305). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00013-7>
- Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F., & Dumonteil, E. (2012). Genetics and evolution of triatomines: From phylogeny to vector control. *Heredity*, *108*(3), 190-202. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.71>

- Grandgenett, P. M., Coughlin, B. C., Kirchhoff, L. V., & Donelson, J. E. (2000). Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *110*(2), 409-415. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00275-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00275-9)
- Greif, G., Chiribao, M. L., Díaz-Viraqué, F., Sanz-Rodríguez, C. E., & Robello, C. (2025). *Trypanosoma cruzi* has 32 Chromosomes: A Telomere-to-Telomere Assembly Defines Its Karyotype. bioRxiv.
- Herrerros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). Trypanosoma Cruzi Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes*, *11*(10), 1196. <https://doi.org/10.3390/genes11101196>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, *157*(6), 1262-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Isnard, A., Shio, M. T., & Olivier, M. (2012). Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072>
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzým, K., ... Myler, P. J. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science*, *309*(5733), 436-442. <https://doi.org/10.1126/science.1112680>
- Jackson, A. P., Otto, T. D., Aslett, M., Armstrong, S. D., Bringaud, F., Schlacht, A., Hartley, C., Sanders, M., Wastling, J. M., Dacks, J. B., Acosta-Serrano, A., Field, M. C., Ginger, M. L., & Berriman, M. (2016). Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. *Current Biology*, *26*(2), 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.055>
- Jackson, Y., Alirol, E., Getaz, L., Wolff, H., Combescure, C., & Chappuis, F. (2010). Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*, *51*(10), e69-e75. <https://doi.org/10.1086/656917>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, *337*(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- Kulkarni, M. M., Olson, C. L., Engman, D. M., & McGwire, B. S. (2009). *Trypanosoma cruzi* GP63 Proteins Undergo Stage-Specific Differential Posttranslational Modification and Are Important for Host Cell Infection. *Infection and Immunity*, 77(5), 2193-2200. <https://doi.org/10.1128/IAI.01542-08>
- Lander, N., Chiurillo, M. A., & Docampo, R. (2016). Genome Editing by CRISPR /Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(5), 679-690. <https://doi.org/10.1111/jeu.12338>
- Lander, N., Li, Z.-H., Niyogi, S., & Docampo, R. (2015). CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. *mBio*, 6(4), e01012-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01012-15>
- Laranja, F. S., Dias, E., Nobrega, G., & Miranda, A. (1956). Chagas' Disease: A Clinical, Epidemiologic, and Pathologic Study. *Circulation*, 14(6), 1035-1060. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.14.6.1035>
- Leão, A. C., Viana, L. A., Fortes De Araujo, F., De Lourdes Almeida, R., Freitas, L. M., Coqueiro-dos-Santos, A., Da Silveira-Lemos, D., Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., Teixeira-Carvalho, A., & Bartholomeu, D. C. (2022). Antigenic diversity of MASP gene family of *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*, 24(6-7), 104982. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104982>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lukeš, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D. A., Votýpka, J., & Yurchenko, V. (2018). Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends in Parasitology*, 34(6), 466-480. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.03.002>
- Ma, L., Chen, K., Meng, Q., Liu, Q., Tang, P., Hu, S., & Yu, J. (2011). An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. *Parasitology Research*, 109(4), 1075-1084. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2348-x>
- Manoel-Caetano, F. D. S., & Silva, A. E. (2007). Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de Saúde Pública*, 23(10), 2263-2274. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2007001000002>

- Menos del 10% de las personas con Chagas han sido diagnosticadas—OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.* (2023, abril 13). <https://www.paho.org/es/noticias/13-4-2023-menos-10-personas-con-chagas-han-sido-diagnosticadas>
- Molina, I., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Treviño, B., Serre, N., Sao Avilés, A., & Almirante, B. (2015). Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(10), 6125-6131. <https://doi.org/10.1128/AAC.04660-14>
- Moncayo, Á., & Silveira, A. C. (2017). Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges. En *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 59-88). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00004-6>
- Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K., & Shio, M. T. (2012). Leishmania virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*, *14*(15), 1377-1389. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>
- Ortega-Barria, E., & Pereira, M. E. A. (1991). A novel T. cruzi heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*, *67*(2), 411-421. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90192-2)
- Palenchar, J. B., & Bellofatto, V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *146*(2), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.12.008>
- 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>
- Pech-Canul, Á. D. L. C., Monteón, V., & Solís-Oviedo, R.-L. (2017). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from Trypanosoma cruzi. *Journal of Parasitology Research*, *2017*, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>
- Peng, D., Kurup, S. P., Yao, P. Y., Minning, T. A., & Tarleton, R. L. (2015). CRISPR-Cas9-Mediated Single-Gene and Gene Family Disruption in Trypanosoma cruzi. *mBio*, *6*(1), e02097-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02097-14>

- Peng, D., & Tarleton, R. (2015). EuPaGDT: A web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microbial Genomics*, 1(4). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000033>
- Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., De Fuentes-Vicente, J. A., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., & Flores-Villegas, A. L. (2022). Enfermedad de Chagas: Biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.449>
- Pérez-Molina, J. A., José A. Pérez-Molina, Molina, I., & Israel Molina. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82-94. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31612-4)
- Pinazo, M.-J., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., Del Cacho, E., Soy, D., & Gascon, J. (2010). Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4896-4899. <https://doi.org/10.1128/AAC.00537-10>
- Pirez, Basmadján, Borbonet, Giachetto, Giambruno, & Lauría. (2017). Transmisión vertical del *Trypanosoma cruzi*. Consideraciones y recomendaciones acordadas en la Mesa Final de la Jornada. *REVISTA MEDICA DEL URUGUAY*, 33(4). <https://doi.org/10.29193/RMU.33.4.5>
- Rassi, A., 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 Jr, A., Rassi, S. G., & Rassi, A. (2001). Sudden death in Chagas' disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 76(1). <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2001000100008>
- Rath, D., Amlinger, L., Rath, A., & Lundgren, M. (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- Reis-Cunha, J. L., Rodrigues-Luiz, G. F., Valdivia, H. O., Baptista, R. P., Mendes, T. A. O., De Moraes, G. L., Guedes, R., Macedo, A. M., Bern, C., Gilman, R. H., Lopez, C. T., Andersson, B., Vasconcelos, A. T., & Bartholomeu, D. C. (2015). Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct

- Trypanosoma cruzi strains. *BMC Genomics*, 16(1), 499. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1680-4>
- Rivadeneira Villacís, Z. A. (2016). *Proteasas, citoesqueleto de actina y permeabilidad de la membrana de la célula hospedera durante las fases tardías del ciclo intracelular de Trypanosoma cruzi* [Tesis de grado]. Universidad católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. <https://repositorio.puce.edu.ec/items/4a24c862-2364-447b-b30f-ae5a3559c08a>
- Russell, D. G., & Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *The Journal of Immunology*, 136(7), 2613-2620. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.136.7.2613>
- Salvatella, R. (2016). Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención. *Archivos de Pediatría del Uruguay*.
- Salvatella, R., Irabedra, P., & Castellanos, L. G. (2014). Interruption of vector transmission by native vectors and “the art of the possible”. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(1), 122-130. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140338>
- Schlagenhauf, E., Etges, R., & Metcalf, P. (1998). The crystal structure of the *Leishmania* major surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*, 6(8), 1035-1046. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(98\)00104-x](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00104-x)
- 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>
- 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>
- 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>
- Tomasina, R., González, F. C., Cabrera, A., Basmadján, Y., & Robello, C. (2024). From Trypomastigotes to Trypomastigotes: Analyzing the One-Way Intracellular Journey of *Trypanosoma cruzi* by Ultrastructure Expansion Microscopy. *Pathogens*, 13(10), 866. <https://doi.org/10.3390/pathogens13100866>

- Tyler, K. M., Olson, C. L., & Engman, D. M. (2003). The Life Cycle Of *Trypanosoma Cruzi*. En K. M. Tyler & M. A. Miles (Eds.), *American Trypanosomiasis* (Vol. 7, pp. 1-11). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9206-2_1
- Van Overtvelt, L., Vanderheyde, N., Verhasselt, V., Ismaili, J., De Vos, L., Goldman, M., Willems, F., & Vray, B. (1999). *Trypanosoma cruzi* Infects Human Dendritic Cells and Prevents Their Maturation: Inhibition of Cytokines, HLA-DR, And Costimulatory Molecules. *Infection and Immunity*, 67(8), 4033-4040. <https://doi.org/10.1128/iai.67.8.4033-4040.1999>
- Walker, D. M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B. S., Drew, M. E., & Satoskar, A. R. (2014). Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7), 1245-1263. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1491-1>
- WHO. (2025, abril 2). *Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. [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))
- Yao, C. (2010). Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infection and Immunity*, 78(1), 22-31. <https://doi.org/10.1128/IAI.00776-09>
- Zeledon, R., & Rabinovich, J. E. (1981). Chagas Disease: An Ecological Appraisal With Special Emphasis on its Insect Vectors. *Annual Review of Entomology*, 26(1), 101-133. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.26.010181.000533>
- 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>
- Zuma, A. A., da Silva, R. B., Garden, S. J., & de Souza, W. (2021). *In vitro* study of the trypanocidal activity of anilinophenanthrolines against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology International*, 83, 102338. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102338>