



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LA SEÑAL DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE LA
SUBUNIDAD TcRPA31 DE LA RNA POL I DE *Trypanosoma cruzi*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ISRAEL FELIPE CANELA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Canela Pérez Israel Felipe
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

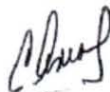
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 13 de enero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis **"Caracterización de la señal de localización nuclear de la subunidad TcRPA31 de la RNA POL I de Trypanosoma cruzi"**, dirigida por el/la Dr(a). **Hernández Fernández Roberto José Rafael**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	González Halphen Diego
VOCAL	González Pedrajo Bertha María Josefina
VOCAL	Peraza Reyes Carlos Leonardo
VOCAL	Torres Quiroz Francisco
SECRETARIO	Servín González Luis

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de enero de 2020



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
COORDINADORA

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por apoyarme durante mis estudios de posgrado y así fortalecer mi formación académica y científica.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haber apoyado y financiado mis estudios de doctorado (beca 429279).

Agradezco al Programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP), por el apoyo económico recibido durante mi estancia en la universidad Rockefeller, así como su apoyo para poder asistir a los congresos nacionales e internacionales.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA, UNAM, por el apoyo financiero del proyecto “**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA TcRPA31 SUBUNIDAD DE LA RNA POL I DE *T. cruzi***” (IN206519).

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández

Dra. María Soledad Funes Argüello

Dr. Roberto Coria Ortega

Gracias por su apoyo, conocimiento, observaciones e invaluable consejos.

Agradecimientos

De manera muy especial le quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Gracias por darme su apoyo, sus invaluable consejos y compartir conmigo su experiencia y conocimientos. Le agradezco por guiarme en mi carrera y fortalecer mi formación científica. Gracias por enseñarme que la mejor manera de abordar un problema científico es con calma y con paciencia.

A la Dra. Imelda López Villaseñor, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Gracias por sus comentarios, su apoyo y acertados consejos que sirvieron para enriquecer desde otra perspectiva mi trabajo de investigación, me ayudaron a fortalecer mis debilidades.

A la Dra. Ana María Cevallos Gaos, del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Le agradezco sus consejos.

A mis sinodales, al Dr. Diego González Halphen, a la Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo, al Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes, al Dr. Francisco Torres Quiroz y al Dr. Luis Servín González, por sus valiosas observaciones al revisar esta tesis.

Al Dr. Michael Rout por aceptar mi visita al laboratorio de biología estructural de la Universidad Rockefeller. Al Dr. Javier Fernández Martínez y al Dr. Samson Obado, por hacer posible mi visita a la Universidad Rockefeller.

A la M. en C. Juliana Herrera López, le agradezco el apoyo técnico y el tiempo que me brindó durante mi estancia en el laboratorio.

A la M. en C. Karla Concepción López Pacheco, le agradezco el apoyo técnico que me dio durante mi estancia en el laboratorio, especialmente por los consejos en las técnicas de mutagénesis y pull-down.

Al Dr. Ernesto Guerrero Sánchez, por sus enseñanzas, su amistad y por la construcción del plásmido pTE que resultó ser una herramienta muy valiosa en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio y a los compañeros del Instituto de investigaciones biomédicas por su apoyo y consejos.

Dedicatoria

A mi madre Gloria Pérez Rodríguez por su apoyo incondicional.

A mi compañera de vida Gabriela Rosello por su apoyo.

A mis sobrinos Said y Kaleb por sus sonrisas y momentos agradables.

Dedicado a todos los científicos que han dedicado su vida al fortalecimiento y enriquecimiento de la biología: Charles Darwin, Alfred Russel Wallace, Theodosius Dobzhanski, Jean Baptiste Lamarck, Gregor Mendel, Carolus Linnaeus, Robert Hooke, Anton van Leeuwenhoek, Theodor Schwann, Matthias Schleiden, Rudolf Virchow, Francesco Redi, Louis Pasteur, Stanley Miller, Aleksandr Oparin, John Haldane, Harold Urey, Linus Pauling, Lynn Margulis, Alexander Fleming, Oswald Avery, Martha Chase, Erwin Chargaff, Rosalind Franklin, James Watson, Francis Crick, Matthew Meselson, Franklin Stahl...

ÍNDICE	
ABREVIATURAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	
PRÓLOGO	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.2 Ciclo de Vida de <i>T. cruzi</i>	5
1.3 Enfermedad de Chagas	8
1.4 Núcleo celular	10
1.5 Nucléolo	14
1.6 Ribosomas y su biogénesis	17
1.7 RNA Polimerasa I	20
1.8 RPA31, una subunidad de RNA Pol I específica y esencial en tripanosomas	23
1.9 Complejo de poro nuclear	24
1.10 Transporte nuclear de proteínas mediante la vía clásica	27
1.11 Señales de localización nuclear	30
1.12 Importina α	35
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
3. OBJETIVO	40
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	40
4. HIPÓTESIS	41
5. METODOLOGÍA	42

5.1 Cultivos del parásito	42
5.2 Amplificación de ácidos nucleicos por PCR	42
5.3 Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	45
5.4 Clonación de productos amplificados en el vector pGEM-T-easy y transformación de células competentes	45
5.5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina	46
5.6 Construcciones plasmídicas	47
5.7 Transfección de <i>T. cruzi</i>	47
5.8 Microscopía de fluorescencia	48
5.9 Inmunoréplica tipo Western Blot	49
5.10 Ensayos de interacción	50
5.11 Análisis <i>in silico</i>	51
6. RESULTADOS	52
6.1 Expresión y localización celular de RPA31-EGFP en el crecimiento y la diferenciación a metaciclologénesis	52
6.2 Identificación <i>in silico</i> de la señal de localización nuclear potencial de TcRPA31	55
6.3 Disección funcional de la señal de localización nuclear de TcRPA31	57
6.4 Inhibición de la importación nuclear de TcRPA31 con ivermectina	59
6.5 Conservación de estructura y dominios ARM de TcImportina- α	60
6.6 Abundancia y localización subcelular de TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis en el crecimiento y la diferenciación a metaciclologénesis	63
6.7 Deleción del extremo amino de TcImportina- α	68
6.8 Co-localización e interacción entre TcImportina- α -6xHis y TcRPA31-EGFP	69
6.9 Interacción entre la señal de localización nuclear de TcRPA31 y TcImportina- α -6xHis	71

6.10 Efecto de ivermectina en la interacción entre la NLS de TcRPA31 y TcImportina- α	73
6.11 Predicción de señales de localización nuclear clásicas (cNLSs) en el proteoma nuclear de <i>T. brucei</i> y de <i>T. cruzi</i>	74
6.12 Identificación de secuencias consenso para importación nuclear en tripanosomátidos	76
7. DISCUSIÓN	78
8. CONCLUSIONES	83
9. REFERENCIAS	84
10. APÉNDICE	101

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
°C	grados Celsius
μg	microgramo(s)
μL	microlitro(s)
μm	micrómetro(s)
μM	micromolar
NLS	Señal de localización nuclear
cNLSs	Señales de localización nuclear clásicas
NPC	Complejo de poro nuclear
kDNA	DNA del cinetoplasto
rDNA	DNA ribosomal
h	hora(s)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kb	kilobases
kDa	kilodaltones
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LIT	Medio de cultivo de infusión de hígado y triptona
min	minutos
M	Molar
mL	mililitro(s)
mM	milimolar
ng	nanogramo(s)
nm	nanómetro(s)
pb	pares de bases

pre-RNA	RNA precursor
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA Pol	RNA Polimerasa
RNasa	Ribonucleasa
rRNA	RNA ribosomal
RRM	Motivo de reconocimiento a RNA

Lista de aminoácidos y sus abreviaturas

NOMBRE	SÍMBOLO
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Aspartato	D
Cisteína	C
Glutamina	Q
Ácido glutámico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptófano	W
Tirosina	Y
Valina	V

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema que muestra la conformación y composición celular de <i>T. cruzi</i> en su fase de epimastigote	4
Figura 2. Representación de los estadios que experimenta <i>T. cruzi</i> en su ciclo de vida	7
Figura 3. Manifestaciones cutáneas y signo de Romaña ocasionado por la infección con <i>T. cruzi</i>	9
Figura 4. Ultraestructura nuclear de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de <i>T. cruzi</i>	12
Figura 5. Representación del mecanismo de <i>trans-splicing</i>	13
Figura 6. Ultraestructura nucleolar de <i>T. cruzi</i> con tinción de plata	16
Figura 7. Esquema del cistrón ribosomal de tripanosomátidos y <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 8. Estructura de la RNA Polimerasa I de <i>S. cerevisiae</i>	21
Figura 9. Estructura del complejo de poro nuclear de <i>S. cerevisiae</i>	26
Figura 10. Ilustración esquemática de tres vías de importación nuclear de proteínas	29
Figura 11. Representación esquemática de las proteínas nucleares de tripanosomátidos que presentan una NLS funcional	33
Figura 12. Estructura de importina α en unión con una cNLS	37
Figura 13. Localización subcelular de TcRPA31-EGFP	53
Figura 14. Expresión de la proteína de fusión TcRPA31-EGFP	54
Figura 15. Potencial señal de localización nuclear conservada en RPA31 de tripanosomátidos	56
Figura 16. Localización celular de versiones escindidas de TcRPA31-EGFP	58
Figura 17. Inhibición de la importación nuclear de TcRPA31-EGFP con ivermectina	59
Figura 18. Alineamiento entre ortólogos de importina α y su predicción estructural	61
Figura 19. Expresión de TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis	64
Figura 20. Expresión de TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis en epimastigotes en crecimiento exponencial y estacionario	65

Figura 21. Localización subcelular de TcImportina- α -EGFP en el crecimiento y la diferenciación de epimastigotes <i>in vitro</i>	66
Figura 22. Inmunolocalización de TcImportina- α -6xHis en el crecimiento y la diferenciación de epimastigotes <i>in vitro</i>	67
Figura 23. Localización subcelular de Δ IBB-EGFP e IBB-EGFP	68
Figura 24. Co-localización e interacción entre TcImportina- α -6xHis y TcRPA31-EGFP	70
Figura 25. Interacción entre versiones escindidas de TcRPA31-EGFP y TcImportina- α -6xHis	72
Figura 26. Efecto de ivermectina en la interacción NLS-EGFP y TcImportina- α -6xHis <i>in vitro</i>	73
Figura 27. Predicción de cNLSs del proteoma nuclear de <i>T. brucei</i> y de <i>T. cruzi</i> con el programa PSORT II	75
Figura 28. Weblogs que muestran la frecuencia relativa de aminoácidos que conforman las cNLS de tripanosomátidos	77

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Subunidades de las RNA Pol I en *T. cruzi*, *T. brucei* y *S. cerevisiae* 22

Tabla II. Construcciones de TcRPA31 y TcImportina α 43

PRÓLOGO

Esta tesis versa sobre el transporte nuclear de proteínas en tripanosomátidos, específicamente sobre la proteína RPA31 de *Trypanosoma cruzi*, la cual es una subunidad de la RNA polimerasa I en estos organismos. Inicialmente, son descritos los aspectos generales de la biología de *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas (ocasionada por este parásito). Es descrita de manera general, la composición nuclear de eucariontes y tripanosomátidos, enfatizando la organización y función del nucléolo. Hay información concerniente a la biogénesis de ribosomas, así como al funcionamiento y estructura de la RNA Polimerasa I que participa en la síntesis de RNA ribosomal en el nucléolo. Después, es descrita la importancia de los complejos de poro nuclear. Se comenta sobre su composición y estructura, así como su función mediadora en el mecanismo clásico de transporte nuclear de proteínas en eucariontes. Es detallada la clasificación de los motivos proteicos de reconocimiento clásicos en el transporte nuclear canónico de organismos modelo, y los hallazgos reportados en tripanosomátidos. Es destacada la función del transportador soluble importina α de la vía clásica de transporte y su importancia en el proceso de importación de proteínas nucleares.

En los resultados es mostrada la abundancia y localización subcelular de TcRPA31 (Fusionada a la proteína fluorescente EGFP), así como cambios observados durante el crecimiento y la diferenciación (metacicloogénesis). Se muestran análisis informáticos y experimentales que demuestran que TcRPA31 porta una señal de localización nuclear funcional que es reconocida por el factor de transporte nuclear TcImportina α . Los modelos estructurales y las secuencias proteicas ortólogas de importina α en tripanosomátidos son analizados comparativamente. También se presentan resultados relativos a la expresión y localización subcelular de TcImportina α (condiciones de el crecimiento y la diferenciación a metacilcoogénesis). Finalmente, es mostrado un análisis detallado sobre las señales de localización nuclear de tipo clásico en los proteomas nucleares de *T. cruzi* y *T. brucei* para proponer secuencias consenso de importación nuclear para tripanosomátidos.

Relativo a la publicación del trabajo realizado se citan los siguientes productos.

1. Canela-Pérez I, López-Villaseñor I, Cevallos AM, Hernández R. (2018). Nuclear distribution of the Trypanosoma cruzi RNA Pol I subunit RPA31 during growth and metacyclogenesis, and characterization of its nuclear localization signal. Parasitol Res.117(3):911-918. DOI:10.1007/s00436-018-5747-4.
2. Canela-Pérez I, López-Villaseñor I, Mendoza L, Cevallos AM, Hernández R. (2019). Nuclear localization signals in trypanosomal proteins. Mol Biochem Parasitol. 229:15-23. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2019.02.003.

RESUMEN

En nuestro laboratorio se estudian aspectos de la biología fundamental del protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*. La proteína TcRPA31 es una subunidad específica de tripanosomátidos que forma parte del complejo RNA Polimerasa I, que transcribe los genes de RNA ribosomal. Con el interés de identificar y caracterizar una posible señal de localización para el transporte nuclear en esta proteína, se hicieron estudios moleculares y celulares de una versión recombinante que fusiona la región codificadora de TcRPA31 con la proteína verde fluorescente (EGFP). En esta tesis se describen los hallazgos informáticos y experimentales sobre una región de reconocimiento clásico tipo bipartito que resultó ser suficiente y esencial para dirigir al núcleo de *T. cruzi* las versiones fluorescentes de la proteína estudiada (TcRPA31-EGFP). La droga ivermectina se reconoce en la literatura como inhibidora del transporte nuclear del tipo clásico, representado por los factores solubles de transporte importina α e importina β . Nuestras observaciones indican la sensibilidad a esta droga en el sistema que transporta TcRPA31-EGFP al núcleo de *T. cruzi*, lo que apoya la participación de importina α e importina β en el transporte nuclear de TcRPA31.

Adicionalmente, por primera vez se reporta la capacidad de la TcImportina α de reconocer a la proteína nucleolar TcRPA31. Se concluye que en *T. cruzi* la vía clásica de transporte de proteínas nucleares es funcional, al menos en la interacción de TcRPA31 (como proteína cargo) con el primer factor soluble de transporte TcImportina α . La conservación evolutiva de esta vía presente en células que divergieron tempranamente refuerza la hipótesis de que el transporte de proteínas nucleares tiene un origen evolutivo temprano, quizá podría haber estado presente en el organismo hipotético “primer ancestro eucariota común”, FECA por sus siglas en inglés.

ABSTRACT

Our research group is interested in fundamental biology of *Trypanosoma cruzi*. In this study, we describe cellular events related to the nuclear import of the protein TcRPA31. This protein is a trypanosomatid-specific essential subunit of the RNA Polymerase I complex, which transcribes ribosomal RNA genes in eukaryotic cells. Interested in the characterization of a potential nuclear localization signal that could be recognized for the nuclear transport of this protein, we carried out plasmid constructs that encode for recombinant versions of this protein as chimaeric fusions with the green fluorescent protein (EGFP). This thesis describes both *in silico* and experimental findings related to a classic nuclear localization signal of the bipartite type present in TcRPA31. It is here shown that this motif is essential and sufficient for directing the fluorescent chimeras (TcRPA31-EGFP) to the nucleus of *T. cruzi* transfected cells. The drug ivermectin has been recognized as a nuclear transport inhibitor, specific for the so called nuclear import classical pathway. This process is carried out with the participation of both soluble factors of transport importin α and importin β . Our findings indicate that the system that transports TcRPA31-EGFP to the *T. cruzi* nucleus is sensitive to ivermectin, which supports the participation of the classical nuclear transport pathway importins α/β . In addition, and as an original contribution in the study of kinetoplastids, the ability of TcImportin α to recognize the nucleolar protein TcRPA31 is reported for the first time. It is supported that in *T. cruzi*, the classic nuclear protein transport pathway is functional, at least in the interaction of TcRPA31 (as cargo protein) with the first soluble transport factor TcImportin α . The presence of a functional importin α and importin β transport system in cells that diverged early in the evolution of eukaryotic lineages, reinforces the hypothesis that the transport of nuclear proteins has an early evolutionary origin. Possibly, it could have been present in the hypothetical organism "first eukaryotic common ancestor" (FECA).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un eucarionte unicelular flagelado perteneciente al reino protista, formando parte del phylum *Euglenozoa* y clasificado dentro de la familia Trypanosomatidae (Lukeš *et al.*, 2014; Deschamps *et al.*, 2011). Este protozoario es de gran importancia médica ya que es el agente causal de la tripanosomiasis americana, mejor conocida como enfermedad de Chagas. Es un microorganismo aerobio que se divide por fisión binaria, presenta organelos característicos de una célula eucarionte, sin embargo, se observan estructuras celulares atípicas como el cinetoplasto contenido en una sola mitocondria que es característico del orden Kinetoplastida (Steverding, 2014; de Souza *et al.*, 2010) (Figura 1). El cinetoplasto corresponde a DNA extranuclear localizado en una región bien definida dentro de la mitocondria que al microscopio se observa como una barra redondeada bajo la base flagelar. El DNA del cinetoplasto (kDNA) puede llegar a formar el 30 % de DNA celular, acomodado en una red de 20,000 a 30,000 minicírculos de kDNA condensado (de Souza, 1999; Jensen y Englund, 2012). *T. cruzi* presenta un flagelo que emerge de una región especializada invaginada en la membrana plasmática llamada bolsillo flagelar, su flagelo presenta una estructura de tubulina en un arreglo 9+2 que en conjunto se conoce como axonema. El axonema está ensamblado al cuerpo basal que funciona como un centro organizador de microtúbulos, a su vez el cuerpo basal esta unido al cinetoplasto (Field y Carrington, 2009). *T. cruzi* también presenta organelos llamados glicosomas o microcuerpos que están rodeados por una membrana de bicapa lipídica con un diámetro de 0.2 – 0.3 µm. Estos microcuerpos presentan un contenido característico de los peroxisomas y enzimas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y el glicerol, resultando atípico ya que normalmente estas enzimas se encuentran en el citoplasma de otros eucariontes (Opperdoes y Michels, 1993; Maugeri *et al.*, 2011; Acosta *et al.*, 2019).

T. cruzi es un organismo diploide que presenta dos haplotipos y cuyo genoma está conformado por 67 Mb en el cual el 50 % consiste de secuencias repetidas y contiene 22,570 genes codificadores de proteínas de los cuales 6,159 genes se encuentran en un haplotipo y

6,043 se encuentran en el otro haplotipo, mientras que 10,368 genes no son asignados a un haplotipo particular (El-Sayed *et al.*, 2005).

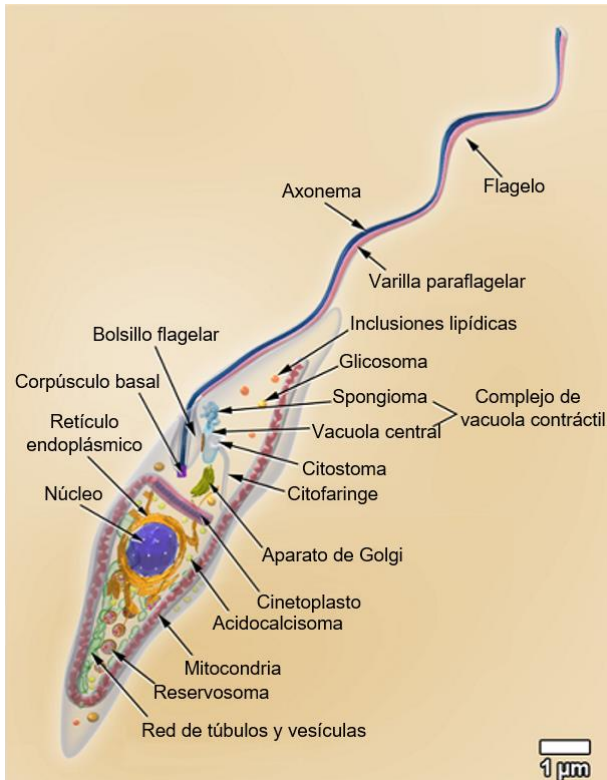


Figura 1 Esquema que muestra la conformación y composición celular de *T. cruzi* en su fase de epimastigote. Se indica cada uno de los organelos que se encuentran en el parásito (Tomado y modificado de Teixeira *et al.*, 2012).

1.2 Ciclo de vida de *T. cruzi*

En la naturaleza, el desarrollo de *T. cruzi* transcurre a través de un ciclo de vida complejo, caracterizado por varias etapas de desarrollo presentes en dos hospederos: un vertebrado y un invertebrado (de Souza, 1984, Schofield y Galvão, 2009). Los insectos vectores del parásito son insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia Triatominae, comúnmente llamados triatominos, entre los que predominan las especies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongilus megistus*, *Triatoma dimidiata*, entre otras (Ramsey *et al.*, 2015). Estos insectos se alimentan al succionar la sangre de un mamífero que puede estar infectado con *T. cruzi*, conduciendo a la ingesta de los tripomastigotes sanguíneos (fase infectiva) y por lo tanto convirtiéndose en nuevos reservorios. Los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes (fase no infectiva) en el estómago del insecto, que posteriormente se dirigen al intestino donde se reproducen y acumulan. En la región rectal del insecto cierta porción de epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son liberados en las heces del insecto. Estos tripomastigotes metacíclicos que han sido liberados, son capaces de infectar a un mamífero mediante el contacto con la herida generada por el insecto hematófago al ingerir la sangre del huésped. Es muy común que la ingesta de sangre por parte del insecto se realice cuando el humano está dormido y los tripomastigotes sean arrastrados cuando el humano se rasca por inercia (Lidani, *et al.*, 2019; Garcia y Azambuja, *et al.*, 1991). Los tripomastigotes infectan a las células fagocíticas, principalmente macrófagos formando una vacuola parasitófora y una vez en el citoplasma de las células del huésped se diferencian a amastigotes, que presentan forma esférica y un flagelo muy corto. Estos amastigotes proliferan intracelularmente y se diferencian a tripomastigotes sanguíneos reventando la membrana celular y así, quedan libres en el torrente sanguíneo para infectar otras células; esta última etapa se puede presentar indefinidamente. El ciclo de vida se completa cuando un insecto vector ingiere la sangre infectada de un huésped portador. Por otra parte, *T. cruzi* no solo es capaz de infectar al humano, sino también a otros mamíferos como: perros, gatos, armadillos, tlacuaches, ratas, ardillas, entre otros. (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006; Velasco-Castrejón y Rivas-Sánchez, 2008).

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes estadios en el ciclo de vida de *T. cruzi* que se aprecian en la figura 2 y se describen de manera más detallada a continuación:

Los epimastigotes presentan una forma elongada con dimensiones de 20-40 μm de largo, el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo del parásito, arrastra la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta que se libera por el extremo anterior del parásito, el cinetoplasto está localizado anterior al núcleo; este estadio se desarrolla en el insecto vector y constituye una de las formas proliferativas de *T. cruzi*.

El amastigote presenta una forma esférica u ovalada de aproximadamente 2-4 μm , presenta un núcleo redondo, un flagelo incipiente y un cinetoplasto en una mitocondria. Este estadio es replicativo y se divide de manera intracelular en las células de mamífero.

Los esferomastigotes presentan una forma esférica con flagelo extracelular que bordea el cuerpo del parásito, éste es un estadio replicativo presente en el estómago del insecto vector.

Los tripomastigotes presentan una forma elongada de 20-25 μm de largo con un diámetro de 2 μm , el cinetoplasto está situado posterior al núcleo y próximo al flagelo naciente que emerge por un costado del cuerpo del parásito y que se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión. Este estadio se encuentra en la sangre del mamífero, en el intestino posterior, el excremento y orina del insecto vector. Este estadio corresponde a la forma infectiva y carece de capacidad replicativa (de Souza, 1984; de Souza, 1999).

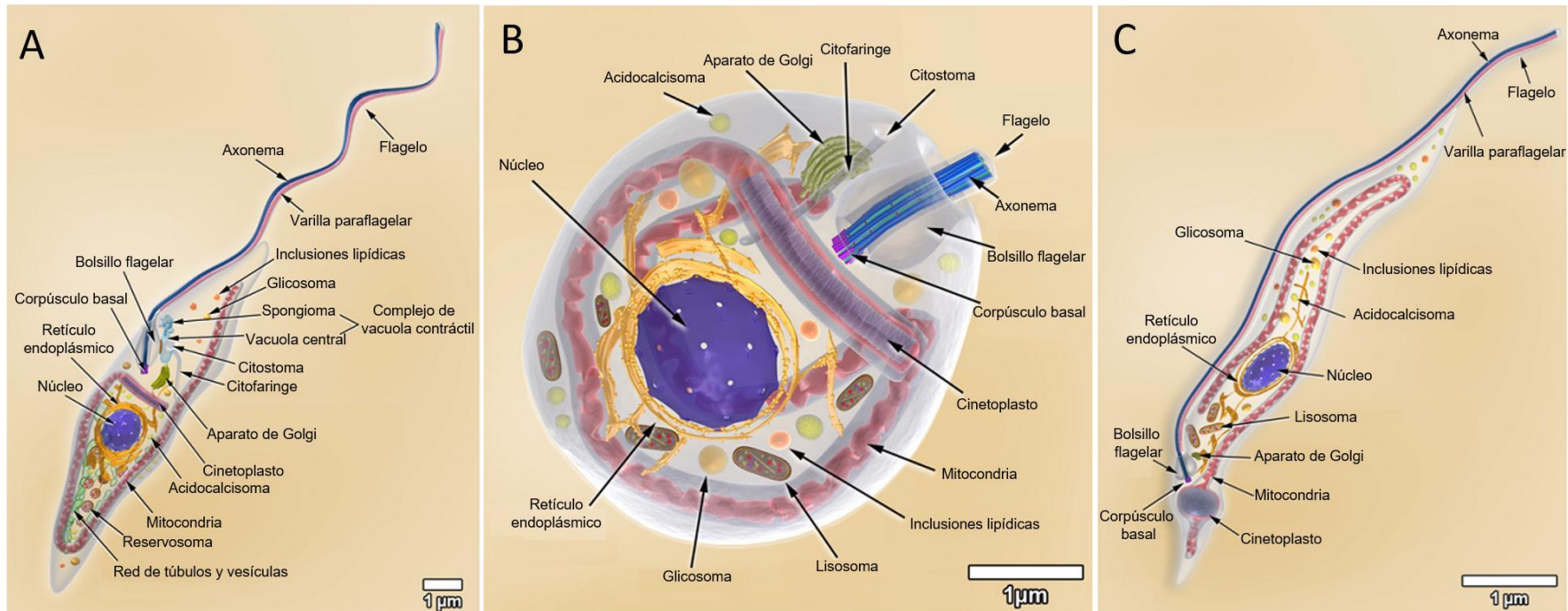


Figura 2 Representación de los estadios que experimenta *T. cruzi* en su ciclo de vida; A) epimastigote, B) amastigote, C) tripomastigote (Tomado y modificado de Teixeira *et al.*, 2012).

1.3 Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana también conocida como enfermedad de Chagas es una enfermedad infecciosa y potencialmente mortal ocasionada por el parásito protozoario *T. cruzi*. Esta enfermedad fue descubierta en 1909 por el Dr. Carlos Chagas, razón por la cual lleva su nombre. Se calcula que en la actualidad alrededor del mundo hay de 6 a 7 millones de personas infectadas con este parásito. La enfermedad de Chagas está clasificada dentro de las 20 enfermedades tropicales desatendidas según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2019). Esta enfermedad es endémica de América Latina, sin embargo, en las últimas décadas su incidencia ha aumentado en Estados Unidos, Canadá y Europa, debido a la movilidad de la población latinoamericana al resto del mundo (Pérez-Molina y Molina, 2018; Velasco y Morillo, 2018). En México en el periodo que comprende entre el año 2000 y 2017 se registraron 9981 casos de personas con enfermedad de Chagas (Agudos y crónicos) (Secretaría de Salud de México, 2019).

La principal forma de transmisión de *T. cruzi* al humano es la vectorial, que se lleva a cabo cuando un triatomino infectado, después de alimentarse de sangre, deposita en la piel o mucosas sus excretas conteniendo tripomastigotes metacíclicos (fase infecciosa de *T. cruzi*). El parásito puede entrar al organismo a través de pérdidas de continuidad de la piel o directamente a través de mucosas (Macedo *et al.*, 2004; Clayton, 2010; Lazzari *et al.*, 2013). Otras maneras de infección que han sido reportadas son la congénita, por transfusión sanguínea, por trasplante de órganos y por vía oral al consumir alimentos y bebidas infectadas con las excreciones del insecto vector (Norman y López Vélez, 2013; Steverding, 2014).

Existen dos fases durante la enfermedad de Chagas denominadas fase aguda y fase crónica (Weiser, 2015). La fase aguda comienza de 6 a 10 días después de la infección y dura de 4 a 8 semanas (Rassi *et al.*, 2012). En esta etapa se presenta inflamación localizada en el sitio de inoculación que, en el caso de ser en la piel, recibe el nombre de chagoma, mientras que cuando entra por la conjuntiva produce un edema palpebral unilateral que recibe el nombre de signo de Romaña (Figura 3). Durante esta fase hay, fiebre, anorexia, diarrea, miocarditis y linfadenopatía (Pinto *et al.*, 2008; Carod-Artal, 2013). La fase aguda se autolimita y pasa a una fase crónica la cual es asintomática en la mayoría de los casos. Sin embargo,

aproximadamente 30% de las personas con infección crónica desarrollan síntomas que pueden aparecer de 10 a 30 años después de la infección inicial (Prata, 2001; Ribeiro *et al.*, 2012). Los órganos más afectados durante esta etapa son el corazón y el tracto gastro intestinal (sobre todo esófago y colon) (Troncon *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2009; Rassi *et al.*, 2010).

Actualmente, las drogas disponibles para tratar la enfermedad de Chagas son benznidazol y nitroimidazol (derivado de nifurtimox), sin embargo, son efectivas solo como tratamiento en la fase aguda, sin ser eficaces en la fase crónica (Bern y Montgomery., 2009). Adicionalmente, ambas drogas generan efectos secundarios como; anorexia, problemas en el sistema digestivo, depresión de la médula ósea, polineuropatía periférica, linfadenopatía, hipersensibilidad, púrpura trombocitopénica, y agranulocitosis (Scarim *et al.*, 2018).

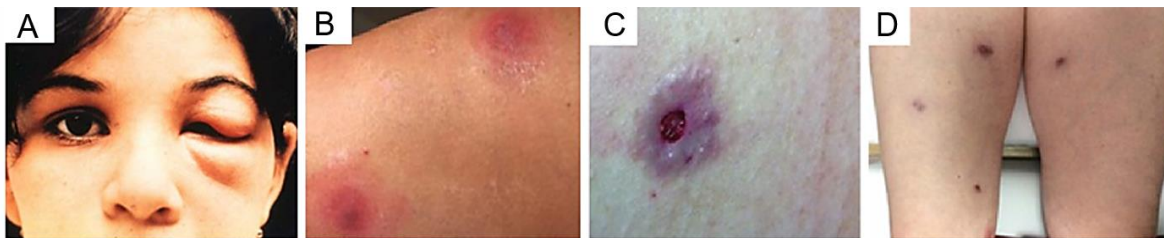


Figura 3 Manifestaciones cutáneas y signo de Romaña ocasionado por la infección con *T. cruzi*. A) Signo de Romaña. B-D) Lesiones cutáneas localizadas en el lugar de inoculación del parásito (Tomado y modificado de Rangel-Gamboa *et al.*, 2019).

1.4 Núcleo celular

El núcleo es el organelo característico que distingue a las células eucariontes, en este ocurren eventos celulares fundamentales como; la replicación del DNA, la transcripción y el procesamiento de diferentes tipos de RNA. La primera célula nucleada surgió hace aproximadamente 2000 millones de años como el primer ancestro de todas las células eucariontes (FECA, First eukariotic common ancestor) (Koumandou *et al.*, 2013). El núcleo está delimitado por una envoltura nuclear formada por dos bicapas lipídicas que están apoyadas mecánicamente por una red de proteínas llamada lamina nuclear. La membrana interna da hacia el nucleoplasma, mientras que la membrana externa da hacia el citoplasma, ambas membranas se encuentran separadas por un espacio perinuclear que conecta con el lumen del retículo endoplásmico (Lamond y Earnshaw, 1998; Trinkle-Mulcahy y Lamond, 2007). La comunicación nucleocitoplasmática de diversos tipos de moléculas se lleva a cabo por los complejos de poro nuclear (NPC) que son complejos macromoleculares adosados a la envoltura nuclear (Kim *et al.*, 2018).

El núcleo de eucariontes multicelulares contiene diferentes subcompartimentos distribuidos en el nucleoplasma como los cuerpos de Cajal, GEMs (Gemini of coiled bodies), speckles, paraspeckles, PLMs (promyelocyte oncogenic domains), nucléolo y compartimentos perinucleolares (Fox y Lamond., 2010; Mao *et al.*, 2011; Nunes y Moretti, 2017).

La estructura nuclear de tripanosomátidos presenta varios cambios en su morfología durante el ciclo de vida de estos parásitos (Esponda *et al.*, 1983; Jiménez-García *et al.*, 1989; Chung *et al.*, 1990; Ogbadoyi *et al.*, 2000). *T. cruzi* presenta una estructura nuclear similar a la de otros organismos eucariontes, con una envoltura nuclear que contiene complejos de poro nuclear (Obado *et al.*, 2016) (Figura 4). En epimastigotes de *T. cruzi* se puede observar un núcleo redondeado con un nucléolo bien definido (de Souza y Meyer 1974; de Souza, 2002). Se observa la presencia de heterocromatina en la periferia nuclear, mientras que los tripomastigotes presentan un núcleo elongado en la región central del cuerpo del parásito sin una estructura nucleolar aparente. En este estadio del parásito se observa una disminución de heterocromatina en la periferia nuclear comparado con epimastigotes (Elias *et al.*, 2001). Con respecto a la distribución de los cromosomas, ésta varía con respecto a la etapa del ciclo celular. Al inicio de la fase S los cromosomas están dispersos; conforme transcurre la mitosis,

los cromosomas se localizan en la periferia nuclear y permanecen ahí hasta que finaliza la división celular. Una vez que finaliza la mitosis los cromosomas vuelven a dispersarse en el nucleoplasma (Elias *et al.*, 2002).

Diferente a la mayoría de otros eucariontes, la transcripción en tripanosomátidos es policistrónica (Clayton, 2019). Los genes de una unidad policistrónica de estos parásitos no codifican para proteínas relacionadas en función, contrastando con lo que ocurre en procariontes y nemátodos (Pettitt *et al.*, 2010). Los mRNA maduros son generados por *trans-splicing* y poliadenilación. En el proceso de *trans-splicing* se agrega un casquete de 39 nucleótidos llamado miniexón o *spliced-leader* (SL) por transesterificación al extremo 5' de cada pre mRNA (Figura 5) (Campbell *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2003). Los sitios de transcripción de la RNA Pol II en tripanosomátidos están dispersos a lo largo del nucleoplasma, con el sitio transcripcional específico de los genes codificantes del *spliced-leader* concentrados en una región adyacente al nucléolo. En *T. cruzi* solo se ha logrado observar un sitio de transcripción del SL, mientras que *T. brucei* tiene dos sitios (Dossin y Schenkman, 2005).

En *T. brucei* la distribución de los genes que codifican para las proteínas variantes de superficie (VSGs) y prociclinas se localizan en las regiones teloméricas de los cromosomas. De manera atípica estos genes VSG son transcritos por la RNA Pol I en una región nuclear conocida como el cuerpo del sitio de expresión (expresión site body) (Navarro y Gull., 2001; Landeira y Navarro 2007). Los genes que codifican para las prociclinas también son transcritos por la RNA Pol I, sin embargo, este proceso se realiza en la periferia nucleolar (Navarro *et al.*, 2007).

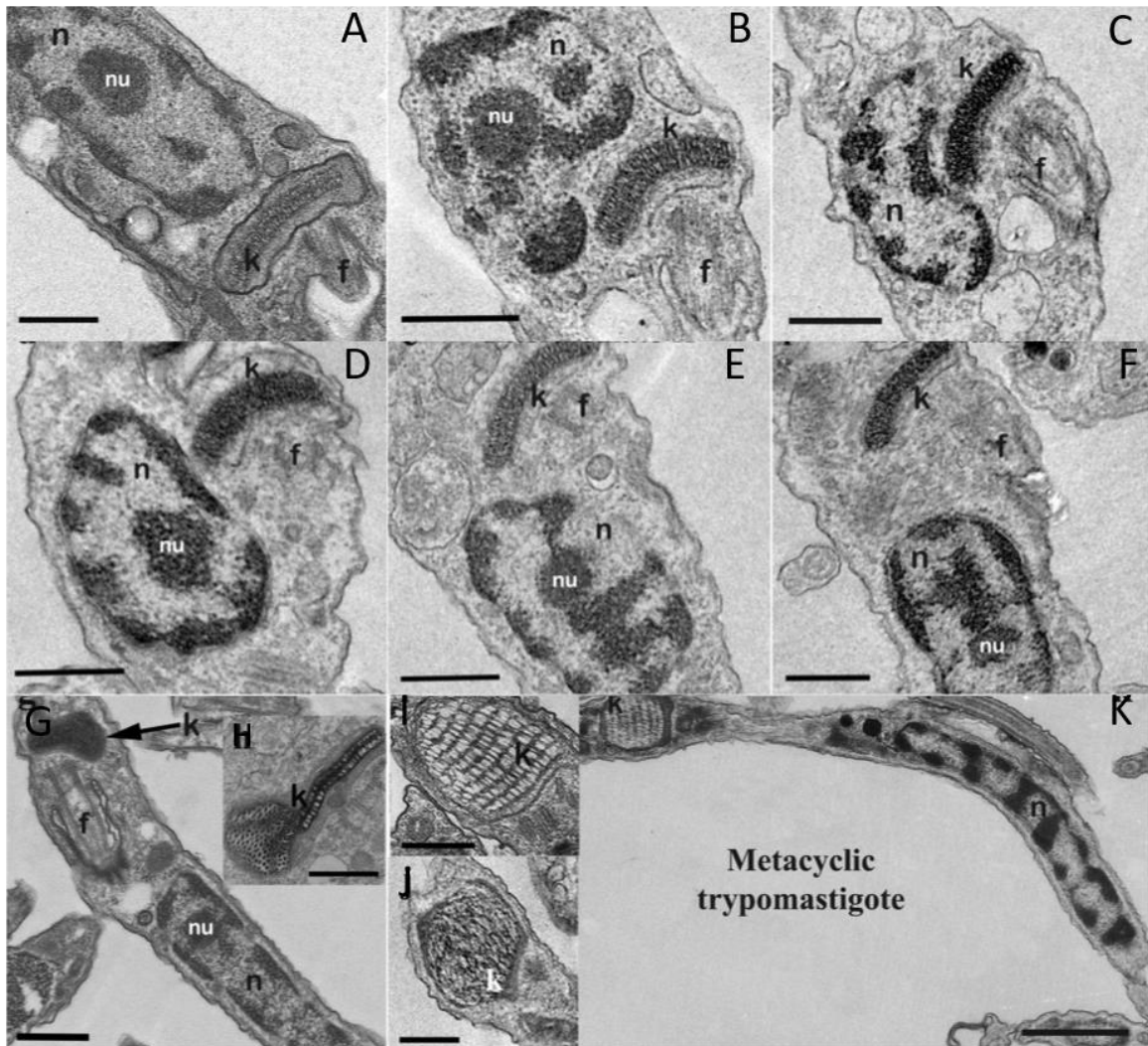


Figura 4 Ultraestructura nuclear de epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*. A-H) Topología nuclear de epimastigotes que transcurren en orden hacia la diferenciación a metaciclogénesis, I,J) Dos tipos de kDNA se observan en tripomastigotes, K) Topología nuclear de tripomastigotes metacíclicos. Con una **n** se indica el núcleo, **nu** es el nucléolo, **f** el flagelo y **k** el cinetoplasto (Tomado y modificado de Gonçalves *et al.*, 2018).

Trans-splicing

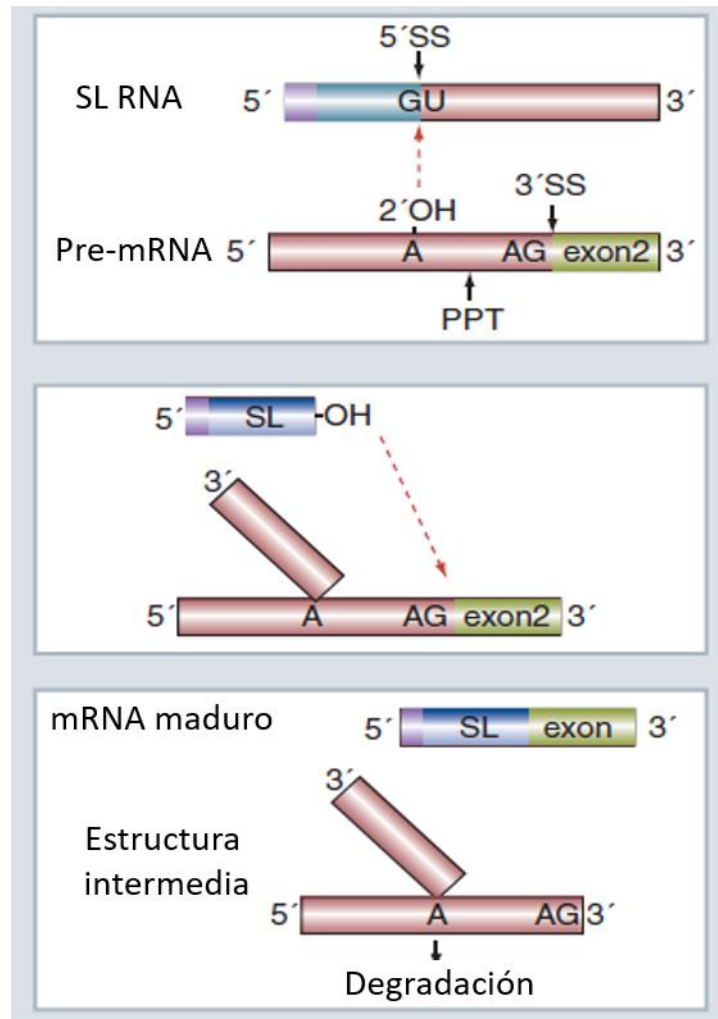


Figura 5 Representación del mecanismo de *trans-splicing*. Se representan los dos pasos de transesterificación. Se indican los sitios de *splicing* 5'(GU) y 3'(AG). Se representa el tracto de polipirimidinas (PPT), *spliced-leader* (SL) y el sitio de *splice* (SS) (Tomado y modificado de Shulamit, 2011).

1.5 Nucléolo

El nucléolo es la estructura ribonucleoproteica más prominente del núcleo en la mayoría de los organismos eucariontes. En este compartimento subnuclear se lleva a cabo la síntesis y procesamiento de rRNA, así como el ensamblaje de los ribosomas (Mélèse y Xue, 1995). Además de los eventos relacionados con la biogénesis de ribosomas, se han encontrado otras funciones relacionadas al nucléolo, como son: la actividad de la telomerasa, regulación del ciclo celular, senescencia y respuesta a estrés (ver revisión de Boisvert *et al.*, 2007). En plantas y mamíferos el nucléolo ha sido extensamente estudiado por microscopía electrónica, presentando una constitución tripartita que consta de centros fibrilares (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC) (Huang, 2002; Mosgoeller, 2004; Olson, 2010). Los FC contienen factores de transcripción de la RNA Pol I tales como el factor de unión río arriba (UBF) y las regiones cromosomales correspondientes a los genes que codifican para el rRNA que junto con proteínas acídicas forman las regiones organizadoras nucleolares (NORs) (Fatica y Tollervey, 2002). El DFC contiene factores que llevan a cabo el procesamiento temprano del pre-rRNA, en esta región también se realizan modificaciones postranscripcionales del rRNA principalmente la pseudouridilación y metilación realizada por la rRNA-pseudouridina sintasa (CBF5), así como otras ribonucleoproteínas conocidas como snoRNPs (Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas) (Hernandez-Verdun *et al.*, 2010). Por otra parte, el GC es el sitio de procesamiento tardío del pre-rRNA y el ensamblaje de las subunidades ribosomales con el rRNA procesado (Tschochner y Hurt, 2003; Lam *et al.*, 2005).

El nucléolo es una estructura dinámica que al entrar en mitosis es desensamblado y la actividad transcripcional decrece (Girke y Seufert, 2019). Durante la profase se observa un incremento de ciclina B1 que favorece la fosforilación de componentes que regulan la transcripción del rRNA como el factor SL1 y el factor terminador de la transcripción (TTF1) (Voit *et al.*, 2015). Los rRNA nacientes permanecen asociados al DFC durante la mitosis y al ser hiperfosforilados desencadenan el desensamblaje nucleolar, acompañado por el desensamblaje de la maquinaria RNA Pol I (Heix *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 2004). En anafase la mayoría de los componentes que participan en el procesamiento del rRNA permanecen asociados a la región pericromosomal (PR) que es un conjunto de componentes del

procesamiento de rRNA distribuidos homogéneamente, como ribonucleoproteínas (RNPs), los RNA nucleolares pequeños U3 (U3 snoRNA), fibrilarina y pre-rRNA, además de proteínas no nucleolares como la nucleoplasmina (Dimario, 2004).

La estructura nucleolar responde al estado en la tasa de crecimiento celular y a la actividad metabólica, indicando que su dinámica es dependiente de estos factores (Grummt, 2013). Durante la interfase la célula necesita una gran cantidad de subunidades ribosomales para la síntesis de proteínas que servirán durante el crecimiento y la división celular (Schöfer y Weipoltshammer, 2018).

Además de su relación con la síntesis y procesamiento de rRNA, existen datos que muestran que en el nucléolo se lleva a cabo el procesamiento y maduración de otros tipos de RNA, como RNAs pequeños transcritos por Pol III como el rRNA 5S, algunos tipos de tRNAs, el RNA de la RNasa P, algunos microRNAs y el RNA de SRP (signal recognition particle) (Gerbi *et al.*, 2003).

El nucléolo de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* corresponde a un compartimento subnuclear fibrogranular compuesto por ribonucleoproteínas dentro del nucleoplasma rodeado por partículas nucleares (fibras y gránulos) y cromatina compacta (Figura 6). Su constitución nucleolar presenta una organización bipartita conformada por el componente fibrilar denso y el componente granular, careciendo de centros fibrilares (López-Velázquez *et al.*, 2005; Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2010). Esta organización bipartita también se ha observado en *T. brucei* (Ogbadoyi *et al.*, 2000).

En un estudio de comparación morfométrica nucleolar de epimastigotes de *T. cruzi* se observó que en crecimiento exponencial el área nucleolar es dos veces mayor que en fase estacionaria y que correlaciona con los niveles de transcripción más elevados en células en crecimiento (Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2010). El nucléolo reduce su tamaño y la tasa de transcripción se ve disminuida durante la transición de la forma proliferativa (epimastigote) a la no proliferativa (tripomastigote) hasta ser desensamblado. Una explicación probable es que la proliferación demanda una mayor transcripción y traducción (Elias *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2018). Además, es aceptado de manera general que la actividad proliferativa correlaciona con la organización nucleolar. La presencia mayoritaria de gránulos en nucléolo y citoplasma en las células en división activa indica la presencia de ribosomas necesarios para la síntesis de proteínas bajo esta condición fisiológica (Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2010).

En *T. cruzi*, durante toda la división celular el nucléolo permanece como un compartimento intranuclear ribonucleoproteico. Conforme avanza la mitosis el nucléolo es tirado por fibras de huso hacia los polos de la célula que formará parte de cada núcleo de las células hijas. Al final de la mitosis se pueden observar nuevos nucléolos antes de la citocinesis (Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2016).

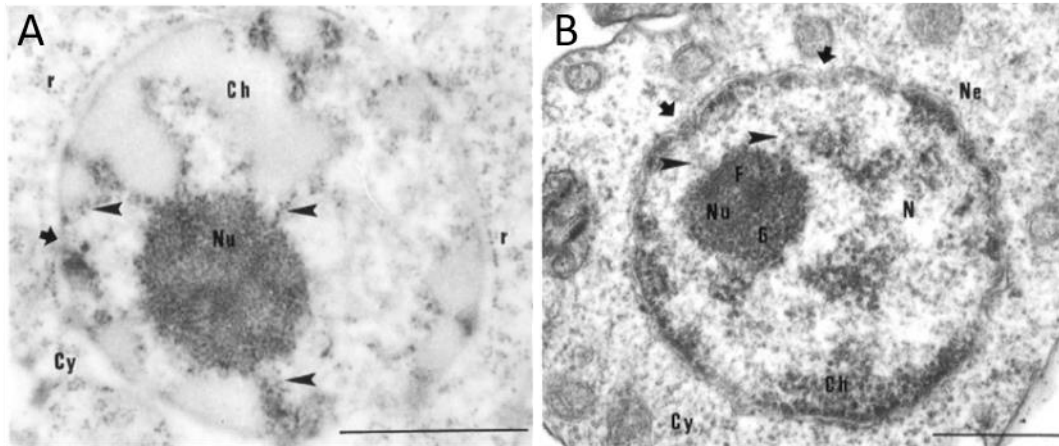


Figura 6 Ultraestructura nucleolar de *T. cruzi* con tinción de plata. A) Núcleo de *T. cruzi* (N) en el que se aprecia el nucléolo y la cromatina en el nucleoplasma. B) Se observa la conformación bipartita del nucléolo (Nu) conformado por el componente fibrilar (F) y el componente granular (G). Se señala el citoplasma (Cy), los ribosomas (r), la cromatina (Ch) y la envoltura nuclear (Ne). Las flechas indican a los complejos de poro nuclear y las puntas de flecha indican partículas nucleares (Tomado y modificado de López-Velázquez *et al.*, 2005).

1.6 Ribosomas y su biogénesis

Los ribosomas son complejos macromoleculares que están compuestos por ribonucleoproteínas que conforman una subunidad menor (SSU) y una subunidad mayor (LSU) que se mantienen juntas formando un complejo cuya función es la síntesis de proteínas (Ramakrishnan, 2014; Schuller y Green, 2019). El peso molecular de los ribosomas de eucariontes unicelulares es aproximadamente de 3.5 MDa y el de eucariontes multicelulares es de 4.3 MDa. Los ribosomas de organismos multicelulares están compuestos de los RNA ribosomales 28S, 5.8S, 5S y alrededor de 49 proteínas en la subunidad 60S, mientras que la subunidad 40S contiene el rRNA 18S y alrededor de 33 proteínas. Sin embargo, el número de proteínas varía dependiendo la especie (Warner, 1999; Melnikov, 2012; Yusupova y Yusupov, 2017).

La biogénesis del rRNA maduro es un proceso complejo que involucra la participación de proteínas no ribosomales y ribonucleoproteínas unidas a RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs) (Tschochner y Hurt, 2003). La transcripción de rRNA en eucariontes se lleva a cabo por la RNA polimerasa I (Sadian *et al.*, 2019). En mamíferos los genes de rRNA consisten en repeticiones de la secuencia codificante de las subunidades 18S, 5.8S y 28S, separadas por regiones espaciadoras internas y externas no codificantes que se transcriben (ITS y ETS). También tiene espaciadores intergénicos no transcritos (Fatica y Tollervey, 2002). Los espaciadores transcritos no codificantes son removidos por endonucleasas y exonucleasas mientras que pseudouridina sintasas y metiltransferasas están involucradas en la modificación postranscripcional de los rRNAs (Tschochner y Hurt, 2003).

El rRNA de *T. cruzi* es atípico presentando una subunidad larga compuesta por dos rRNA largos y 5 cortos (Hernández *et al.*, 1988) (Figura 7). Estas moléculas están codificadas como módulos diferentes en una unidad de transcripción principal. Aproximadamente 100 copias por núcleo, separadas por secuencias mayores a 20 Kb, codificados en al menos 2 cromosomas (Castro *et al.*, 1981; Hernández *et al.*, 1988, Wagner y So, 1990).

El cistrón ribosomal de *T. cruzi* tiene una organización muy particular en un patrón de moléculas de rRNA más complejo que eucariontes superiores. El gen que en otros eucariontes codifica para el rRNA 28S, en *T. cruzi* presenta una discontinuidad interna que

genera la liberación de las moléculas 24S α y 24S β (Hernández *et al.*, 1988). En el cistrón también se encuentran codificadas 5 moléculas pequeñas de rRNA (small rRNA) que son: S1, S2, S3 (esta última equivalente a la subunidad 5.8S de rRNA de otros eucariontes), S4, S6 (Castro *et al.*, 1981; Hernández *et al.*, 1988, Wagner y So, 1990). La molécula pequeña S5 representa al rRNA 5S, que también forma parte de la subunidad ribosomal mayor. Ésta se encuentra codificada como copias en tándem en una región distinta del genoma (Hernández *et al.*, 1988; Hernández *et al.*, 1993; Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Lo genes codificantes del rRNA 5S son transcritos por la RNA Polimerasa III de manera distinta al cistrón ribosomal que es transcrito por la RNA Pol I (Vorländer *et al* 2018). En *Saccharomyces cerevisiae* los genes de rRNA 5s están unidos a la unidad de transcripción de rRNA pero orientados en dirección opuesta (Venema y Tollervey, 1999). En *T. cruzi* y *T. brucei* los genes de rRNA 5s están organizados en un arreglo en tándem y unidos a los genes codificantes de tRNA (Cordingley, 1985; Hernández-Rivas *et al.*, 1992; Moreno-Campos *et al.*, 2016). En *T. brucei* la biogénesis del rRNA 5S involucra proteínas que se encuentran exclusivamente en tripanosomas como son P34 y P37 que resultan ser esenciales para el parásito (Ciganda y Williams, 2012). También se ha reportado que en tripanosomátidos la biogénesis ribosomal disminuye cuando los parásitos alcanzan la fase estacionaria de cultivo (Nardelli *et al.*, 2007, Cevallos *et al.*, 2005).

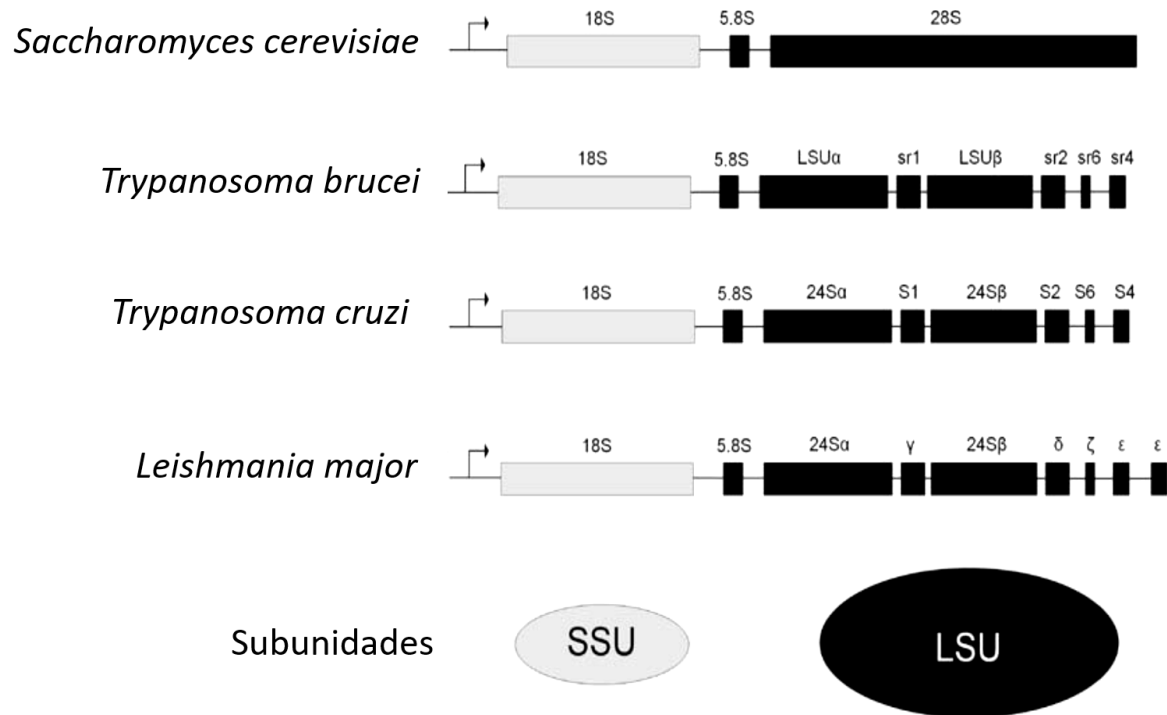


Figura 7 Esquema del cistrón ribosomal de tripanosomátidos y *Saccharomyces cerevisiae* como referencia. La caja gris representa al gen que codifica al RNA 18S de la subunidad menor (SSU), mientras que las cajas negras representan a los genes que codifican a los componentes de la subunidad mayor (LSU). Las subunidades mayor y menor son representadas como un óvalo negro y un óvalo gris respectivamente (Tomado de Hernández y Cevallos, 2014).

1.7 RNA Polimerasa I

La RNA pol I es el complejo molecular encargado en la síntesis de rRNA 18 S, 5.8 S y 28 S en eucariontes, su reclutamiento al promotor de rDNA requiere de la participación de los tres factores de transcripción SL1, RRN3 y UBF para formar el complejo de preiniciación (Paule y White, 2000; Russell y Zomerdijk, 2005). Inicialmente, el factor SL1 reconoce la secuencia promotora y recluta a la RNA pol I asociado a RRN3, posteriormente UBF1 interacciona con SL1 activando la transcripción de la RNA pol I (Goodfellow y Zomerdijk, 2013). La síntesis de rRNA y la biogénesis de ribosomas requieren una gran inversión energética para la célula, por lo que este proceso se encuentra regulado (Albert *et al.*, 2012).

En tripanosomátidos no se ha identificado ningún ortólogo de los factores de transcripción SL1, RRN3 y UBF. A pesar de que se ha caracterizado al factor relacionado a TBP (TRF4) que se une a las regiones codificantes de rRNA, éste no es capaz de unirse a la región promotora (Thomas *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha identificado al factor de transcripción CITFA de Pol I en *T. brucei*. Este factor de transcripción está conformado por 7 proteínas específicas de tripanosomátidos. CITFA se une a la región promotora de los genes codificantes de rRNA, así como a los promotores de los genes que codifican glicoproteínas variantes de superficie (VSGs) y prociclinas, cuya transcripción es realizada de igual manera por Pol I (Brandenburg *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2012; Kirkham *et al.*, 2015).

La RNA Pol I de *S. cerevisiae*, está conformada por 14 subunidades. Las subunidades RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 y RPB12 son compartidas entre RNA Pol I, RNA pol II y RNA Pol III. Las subunidades AC40 y AC19 se comparten únicamente entre la RNA Pol I y la RNA Pol III. Las subunidades que son específicas de la RNA Pol I son A190, A135, A49, A43, A34.5, A14, A12.2 (Vannini y Cramer, 2012; Goodfellow y Zomerdijk, 2013) (Figura 8).

En *T. brucei* se ha logrado identificar a las subunidades RPA1, RPA2, RPA12, RPC19, RPC40, RPB5z, RPB6z, RPB8, RPB10z y RPA31 (Walgraffe *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007; Nguyen 2014). Las subunidades RPB5z, RPB6z y RPB10z son específicas de tripanosomátidos y sólo forman parte de la RNA Pol I ya que sus proteínas RPB5, RPB6 y RPB10 se comparten entre RNA Pol II y RNA Pol III (Kelly *et al.*, 2005;

Gunzl *et al.*, 2007). Hasta ahora para *T. cruzi* solo se disponen de asignaciones informáticas de genes ortólogos (Tabla I).

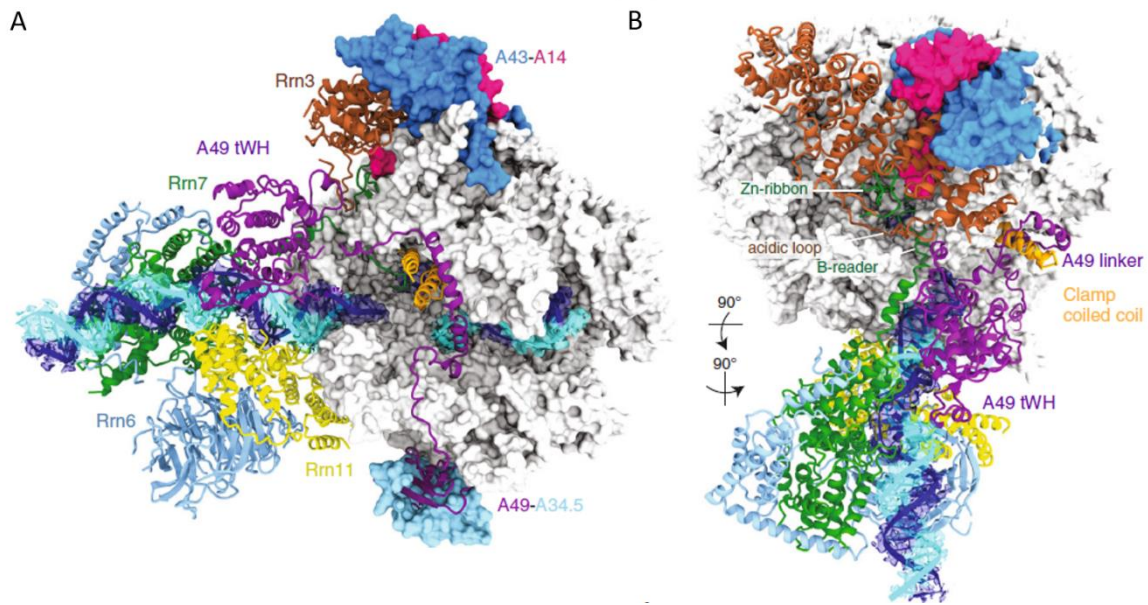


Figura 8 Estructura de la RNA Polimerasa I de *S. cerevisiae*. Se muestra la RNA Polimerasa I (en gris) al interactuar con el rDNA (en azul rey) y con los factores de transcripción específicos. Rrn3 en café, Rrn7 en verde, Rrn6 en azul claro, Rrn11 en azul claro. En color rosa se observa a la subunidad A14 en interacción con la subunidad A43. Se observa a la subunidad A49 en morado interactuando con A34.5 en color azul cielo. (Tomado de Sadian *et al.*, 2019).

Tabla I. Subunidades de las RNA Pol I en *T. cruzi*, *T. brucei* y *S. cerevisiae*

RNAPs	Subunidades de la RNA Pol I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Pol I, Pol II y Pol III (Canónicamente en eucariontes excepto las subunidades RPB5, RPB6 y RPB10 de tripanosomátidos que solo están en Pol II y Pol III)	RPB8	✓	✓	✓
	RPB12	✓	✓	✓
	RPB5	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
	RPB6	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
	RPB10	✓	✓ Pol II y Pol III	✓ Pol II y Pol III
Pol I y Pol III	RPC40	✓	✓	✓
	RPC19	✓	✓	✓
Específicas de Pol I	RPA1	✓	✓	✓
	RPA2	✓	✓	✓
	RPA12	✓	✓	✓
	RPA14	✓	✗	✗
	RPA43	✓	✗	✗
	RPA31	✗	✓	✓
	RPB5z	✗	✓	✓
	RPB6z	✗	✓	✓
	RPB10z	✗	✓	✓

Presencia	✓
Ausencia	✗

Vannini *et al.* (2012). *Molecular Cell*. 45; Park *et al.* (2011). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 180; Nguyen, *et al.* (2007). *Molecular and Cellular Biology*. 27 (17); Nguyen *et al.* (2006). *Mol Biochem Parasitol*. 149; Schimaski *et al.* (2005). *Mol Cell Biol*. 25; Bindereif *et al.* (2012). *Nucleic Acids and Molecular Biology*. 28.

1.8 RPA31, una subunidad de RNA Pol I específica y esencial en tripanosomas

RPA31 es una subunidad de la RNA Pol I específica de la familia Trypanosomatidae. Por estudios de silenciamiento se ha logrado demostrar que es esencial, pues su ausencia resulta letal para *T. brucei*. El número de acceso en la base de datos TriTrypDB.org con descripción del gen RPA31 de la RNA Pol I de *T. brucei* (Nguyen, *et al.*, 2007; Nguyen, *et al.*, 2006; Schimanski, *et al.*, 2005, El-Sayed *et al.*, 2005) es: *T. brucei* TREU927 Tb927.10.3540, mientras que el gen ortólogo para *T. cruzi* se encuentra con el número de acceso TcCLB.510311.110. RPA31 de *T. cruzi* corresponde a una proteína de 184 aminoácidos con un peso aproximado de 21.7 kDa codificada por un gen de 555 pb.

1.9 Complejo de poro nuclear

La expresión génica, el crecimiento y la división celular en eucariontes depende del flujo continuo de moléculas que atraviesan los complejos de poro nuclear. El complejo de poro nuclear corresponde a una estructura macromolecular adosada a la membrana interna y externa del núcleo que controla el transporte bidireccional de diferentes moléculas entre los compartimentos citoplásmico y nucleoplásmico (Beck y Hurt, 2017). Este complejo proteico es el más grande que existe en las células eucariontes, por ejemplo; el peso molecular de esta estructura en levadura es de 60 MDa mientras que en humano es de 120 MDa (comparando el peso molecular de los ribosomas eucariontes que es de 4.3 MDa) (Figura 9). El diámetro del canal presenta un ancho de 40 nm y posee simetría octagonal alrededor del eje central de transporte, conformado por más de 500 copias de 30 proteínas diferentes llamadas nucleoporinas (Rout *et al.*, 2000; Lim y Fahrenkrog, 2006). Existen tres tipos de nucleoporinas: proteínas de la membrana de poro (Poms), nucleoporinas de andamiaje (*core scaffold nups*) y nucleoporinas FG (*FG-repat Nups*) (Fahrenkrog y Aebi, 2003). Las Poms contienen dominios transmembrana que anclan el complejo de poro nuclear a la envoltura nuclear (NE), mientras que las proteínas de andamiaje son principalmente componentes estructurales que interactúan con la envoltura nuclear y las Poms. Las nucleoporinas FG contienen dominios ricos en fenilalanina y glicina (FG). En conjunto los dominios FG dentro del canal del complejo de poro nuclear previenen la difusión pasiva de muchas macromoléculas y a su vez proporcionan sitios de acoplamiento molecular adecuado para los factores de transporte (TF) pertenecientes a la familia de las carioferinas (Hoelz *et al.*, 2016; Obado *et al.*, 2016). Estos factores de transporte nuclear se unen a la proteína cargo y posteriormente interactúan con los dominios FG de las nucleoporinas para atravesar el complejo de poro nuclear (Alber *et al.*, 2007).

El complejo de poro nuclear muestra un alto grado de conservación en su composición y estructura (Alber *et al.*, 2007). Se ha sugerido que las regiones FG han evolucionado como un subgrupo altamente especializado de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) que contienen arreglos conservados de motivos lineales cortos (SLiMs), cuya función es mediar la interacción con múltiples componentes del anillo interno del complejo de poro nuclear. En este modelo evolutivo se propone que al incrementarse el número de SLiMs también se

incrementó la especificidad del transporte, cuya cadena de aminoácidos responsable de la interacción se compone de 2 a 4 residuos (FG, GLFG, o FxFG), asegurando interacciones rápidas. Los factores de transporte (importinas) que interaccionan con los dominios FG de las nucleoporinas pudieron haber evolucionado en paralelo generando un transporte nuclear más eficiente (Hayama *et. al.*, 2017)

Se ha estimado que *T. brucei* tiene entre 200-300 complejos de poro nuclear por núcleo (Rout y Field, 2001). En estudios de proteómica se ha logrado identificar por espectrometría de masas a 22 nucleoporinas que forman parte de este complejo molecular en *T. brucei*; TbMlp-1, TbMlp-2, TbSec13, TbNup48, TbNup82, TbNup89, TbNup96, TbNup109, TbNup132, TbNup144, TbNup181, TbNup225, TbNup53a, TbNup53b, TbNup59, TbNup62, TbNup64, TbNup75, TbNup98, TbNup140, TbNup149, TbNup158. Estas nucleoporinas también se encuentran en metazoos y levaduras, presentando una similitud en su tipo de pliegue, organización de dominios, composición y modularidad. Estos datos proporcionan evidencia de que la arquitectura de los complejos de poro nuclear se encuentra conservada en eucariontes y posiblemente se estableció en el último ancestro común de los eucariontes (DeGrasse *et al.*, 2009; Hayama *et al.*, 2017; Field y Rout, 2019). En un estudio más reciente el mismo grupo identificó 5 nucleoporinas más que forman parte del complejo de poro nuclear de *T. brucei*; TbNup41, TbNup65, TbNup76, TbNup119 y TbNup152, sin embargo, éstas no tienen un ortólogo identificable en las Poms del clado Opisthokonta (Obado *et al.*, 2016). Adicionalmente, *T. brucei* carece de los componentes principales de exportación de mRNA presentes en los complejos de poro nuclear de levadura y vertebrados. Sin embargo, se ha encontrado que la exportación de mRNA en *T. brucei* podría ser mediada por los factores de exportación Mex67 y Mtr2 con la participación de Ran, RBP1 y la proteína activadora de la actividad de GTPasa GAP, sugiriendo que la exportación depende de GTP a diferencia de los organismos pertenecientes al clado Opisthokonta y plantas que utilizan ATP (Obado *et al.*, 2016; Obado *et al.*, 2017).

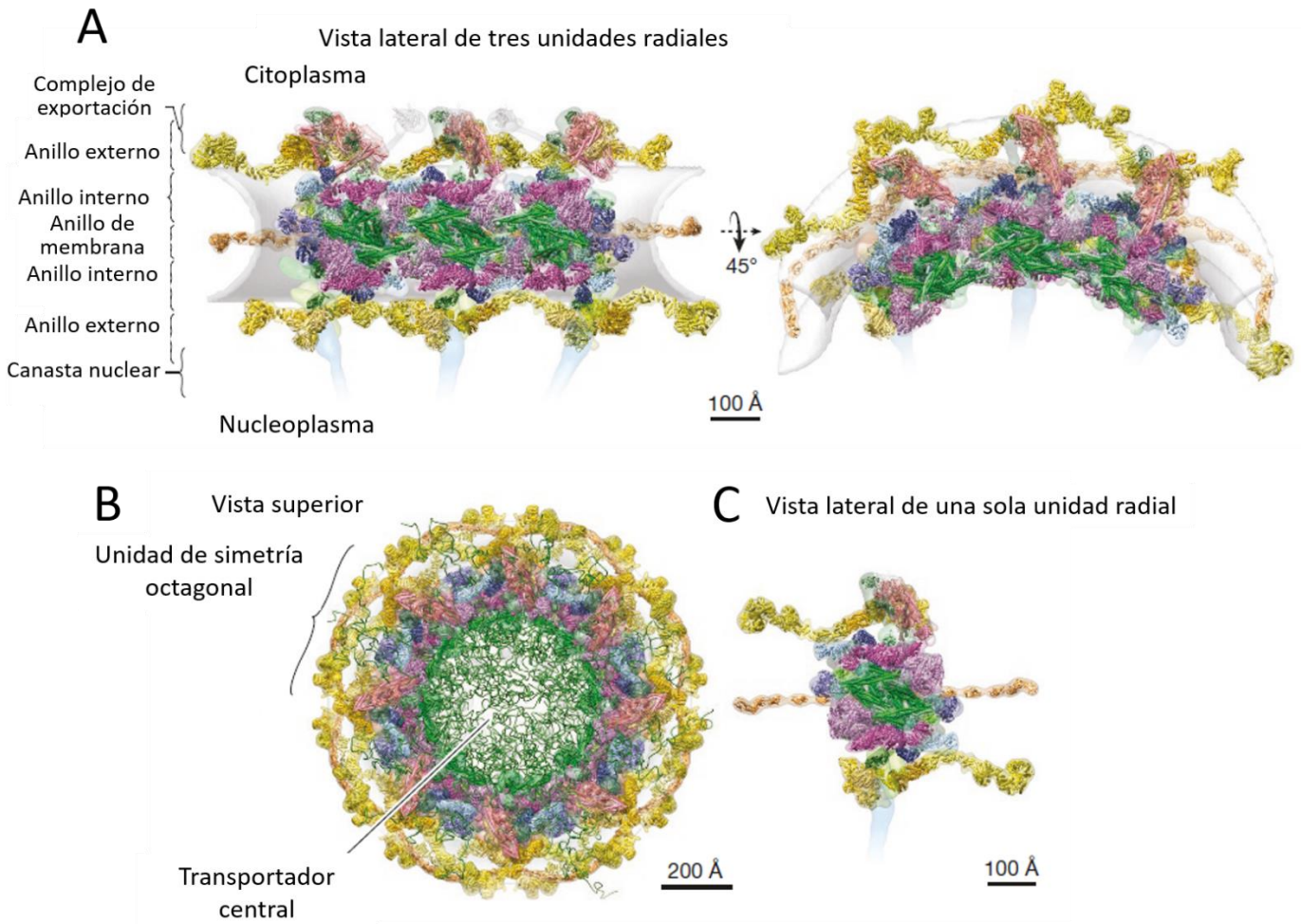


Figura 9 Estructura del complejo de poro nuclear de *S. cerevisiae*. A) Vista lateral y vista en giro de 45° de la estructura del NPC. B) Vista superior de NPC en la que se señala una de las 8 unidades que conforman la simetría octagonal C) Vista lateral de una estructura radial del NPC. Las nucleoporinas FG se muestran en verde. Los anillos de membrana en beige. Los anillos internos se muestran en morado y azul. Los anillos externos se muestran en amarillo. (Tomado y modificado de Kim *et al.*, 2018).

1.10 Transporte nuclear de proteínas mediante la vía clásica

El transporte nuclear de proteínas es un proceso complejo que transcurre a través de los complejos de poro nuclear, en este proceso participan proteínas pertenecientes a la familia de las carioferinas entre las que se encuentran las importinas y las exportinas (Strambio-De-Castilla *et al.*, 2010). El proceso de translocación de proteínas al nucleoplasma mediado por la importina α y la importina β se conoce como vía clásica de importación nuclear (Cauntain *et al.*, 2015). Las proteínas nucleares que serán transportadas desde el citoplasma al interior de núcleo (carga) generalmente tienen motivos proteicos conocidos como señales de localización nuclear (NLS) que son reconocidos por la proteína adaptadora importina- α formando el complejo carga/importina α . Posteriormente, la proteína receptora importina β se une al dominio IBB (Importin beta binding domain) de importina α formando el complejo trimérico de transporte carga/importina α /importina β (Stewart y Rhodes, 1999; Stewart, 2007). El complejo trimérico de transporte carga/importina α /importina β es translocado al nucleoplasma atravesando el complejo de poro nuclear mediado por importina β al interactuar con dominios ricos en fenilalanina y glicina (FG) de las nucleoporinas presentes en el complejo de poro nuclear (Ma *et al.*, 2016). Una vez que el complejo trimérico se encuentra en el nucleoplasma, una proteína de unión a GTP llamada Ran-GTP (perteneciente a la familia RAS) se une a importina β generando un cambio alostérico y así disgregando el complejo trimérico carga/importina α /importina β (Vetter *et al.*, 1999). Importina β permanece unida a Ran-GTP para ser exportada al citoplasma, así, Ran-GTP cumple una función reguladora del transporte nuclear al mantener un ciclo de unión con GTP y GDP, siendo el gradiente de Ran-GTP mayoritario en el nucleoplasma (Görlich *et al.*, 1996; Hoelz y Blobel, 2004). La unión de GTP a Ran es modulada por el factor de intercambio de nucleótido de guanina (RanGEF o RCC1 en Humano) en el núcleo y la proteína activadora de GTPasa de Ran (Ran GAP) en el citoplasma, ambas proteínas distribuidas de manera asimétrica entre el núcleo y citoplasma controlan la unión de Ran a GTP o GDP y por consiguiente la regulación del transporte nucleocitoplásmico (Bischoff y Ponstingl, 1991; Bischoff *et al.*, 1994; Moroiianu *et al.*, 1996; King *et al.*, 2006). Por otra parte, importina α es exportada al citoplasma mediante la exportina CAS (the celular apoptosis susceptibility gene product) en complejo con RanGTP (Kutay *et al.*, 1997; Stewart, 2007). Una vez en el

citoplasma los complejos exportados RanGTP-CAS-importina- α y RanGTP-importina β son disociados por la hidrólisis de RanGTP generando RanGDP. La actividad de GTPasa de Ran es estimulada por la proteína activadora de GTPasa RanGAP1 (Seewald *et al.*, 2002). Adicionalmente las proteínas RanBP1 o RanBP2 estimulan a RanGAP1 para la activación de GTPasa de Ran (Matunis *et al.*, 1996; Vetter *et al.*, 1999; Ritterhoff *et al.*, 2016). La direccionalidad del transporte nucleocitoplásmico está dada por el gradiente diferencial de RanGTP entre el núcleo y el citoplasma, presentando una concentración mayor en el nucleoplasma (Izaurrealde *et al.*, 1997; Kalab y Heald, 2008). El transporte nuclear de RanGDP depende de NTF2 (Nuclear Factor transport 2) que tiene afinidad por los dominios FG de las nucleoporinas que conforman el NPC (Stewart, 2000; Jovanovic-Taliman *et al.*, 2009). Una vez en el nucleoplasma NTF2-RanGDP es disociado por la reconversión de RanGDP a Ran-GTP realizado por RanGEF (Bischoff y Ponstingl, 1991). La exportina CAS puede regresar nuevamente al núcleo por sí misma.

Las proteínas exportadas al citoplasma contienen un motivo llamado señal de exportación nuclear (NES) que es reconocido por factores de exportación nuclear llamados exportinas. Las exportinas son proteínas pertenecientes también a la familia de las carioferinas. El proceso de exportación nuclear requiere la participación de Ran-GTP que se une a las exportinas (Xu y Massagué, 2004).

En tripanosomátidos la vía de transporte nuclear clásica no ha sido estudiada, sin embargo, en la base de datos TriTrypDB se pueden identificar los genes de importina α , importina β , CAS y Ran (Canela-Pérez *et al.*, 2019). En los genomas de *L. major* y *T. brucei* se han identificado a NTF2, RanGAP, RanBP1 y RCC1 (Casanova *et al.*, 2008).

Es importante señalar que se han reportado vías no clásicas de transporte nuclear de proteínas, por ejemplo; existen proteínas que son transportadas al núcleo directamente por importina β , sin la participación de importina α . Las proteínas que han sido descritas son: la proteína paratiroide PTHrP (Cingolani *et al.*, 2002), el factor nuclear de transcripción SCREBP2 que es esencial para el metabolismo del colesterol (Lee *et al.*, 2003) y la proteína de dedo de zinc C2H2 (Choi *et al.*, 2014).

Otra vía consiste en la participación de Snurportina que interacciona con importina α en lugar de hacerlo con importina β , para importar ribonucleoproteínas y proteínas que conforman el espliceosoma (UsnRNPs) (Strasser *et al.*, 2005) (Figura 10).

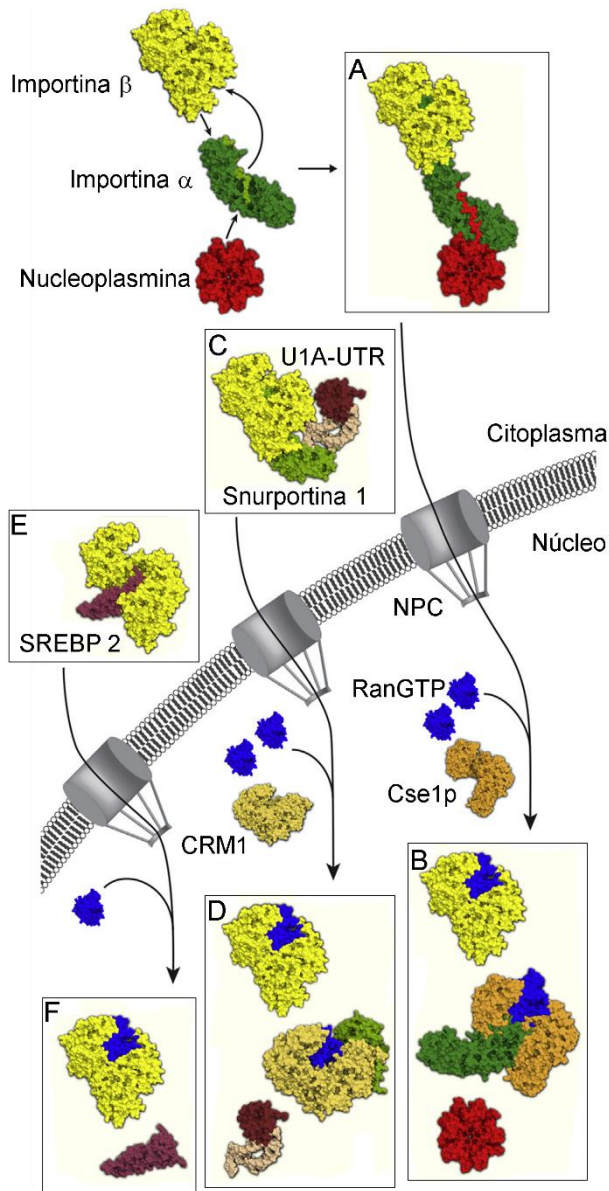


Figura 10 Ilustración esquemática de tres vías de importación nuclear de proteínas. A y B) Vía clásica de importación nuclear de proteínas; cargo (Nucleoplasmina se muestra en rojo), importina- α (en verde) e importina- β (en amarillo) forman un complejo ternario antes de ser translocadas al núcleo atravesando los complejos de poro nuclear (NPC, en gris), RanGTP (en azul) y Cse1p (CAS, en naranja) disocia el complejo y libera el cargo. C y D) Vía de importación de Snurportina-1, cargo (U1A-UTR se muestra en guinda y rosa claro). Snurportina (en verde). RanGTP (azul) y CRM1(en color hueso) E y F) Vía de importación directa mediada por importina β ; cargo (SCREBP2, mostrado en morado), importina β y SCREBP2 forman un complejo binario que es translocado a través del NPC. (Esquema adaptado de Christie *et al.*, 2016)

1.11 Señales de localización nuclear

En las células, algunas proteínas son exclusivamente nucleares, mientras que otras se encuentran en un intercambio dinámico entre el núcleo y el citoplasma (Nigg, 1997; Ernst y Müller-Newen; 2019). La mayoría de las proteínas nucleares contienen un motivo que corresponde a una secuencia de aminoácidos llamada señal de localización nuclear (NLS). Las primeras NLS en ser descritas fueron reportadas en el antígeno mayor del SV40 (₁₂₆PKKKRKV₁₃₂) y en la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* (₁₅₅KRPAATKKAGQAKKKK₁₇₀), clasificadas como monopartitas y bipartitas respectivamente (Kalderon *et al.*, 1984; Dingwall *et al.*, 1988) (Figuras 11Ñ y 11O). Las señales monopartitas y bipartitas se conocen como NLS clásicas (cNLS) por haber sido las primeras en ser descritas (Goldfarb *et al.*, 2004). Estos motivos presentan secuencias enriquecidas con aminoácidos básicos, principalmente lisinas y argininas que resultan indispensables para la importación nuclear de proteínas en mamíferos, plantas, levaduras y proteínas virales (Boulikas, 1993; Makkerh *et al.*, 1996; Bordonné, 2000; Lee *et al.*, 2006b; Lange *et al.*, 2007; Gao y Wong, 2013). Las señales monopartitas están conformadas por una secuencia que va de 4 a 10 residuos de longitud, mientras que las señales bipartitas requieren dos regiones ricas en aminoácidos básicos separadas por una secuencia espaciadora de 10 a 12 residuos no consenso (Robbins *et al.*, 1991; Goldfarb *et al.*, 2004; Marfori *et al.*, 2011; Christie *et al.*, 2016).

Las NLS pueden residir en cualquier región de la proteína nuclear y no son eliminadas después de ser importadas al nucleoplasma. Además, puede haber más de una NLS en una proteína determinada (Sun *et al.*, 2016).

Además de las cNLS, han sido identificadas varias NLSs no clásicas, como son las secuencias PY-NLS que están compuestas por el consenso R/H/KX(2-5)PY (Lee *et al.*, 2006a; Chook y Süel, 2011; Lange *et al.*, 2008). La NLS M9 funciona como un motivo de intercambio entre el núcleo y el citoplasma, está compuesta de 38 residuos (YNDFGNYNNQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPY) y se encuentra en la proteína hnRNP A1 (Siomi y Dreyfuss, 1995). La NLS BIB corresponde a una señal de 42 residuos enriquecida con arginina y glicina (VHSHKKKKIRTSPFRRPKTLRLRRQPKYRRKSAPRRNK) que se encuentra en la proteína ribosomal rpL23 (Jäkel y Görlich, 1998). El dominio RS

corresponde a una señal rica en arginina y serina, en algunas proteínas funciona como señal de importación y en otras como señal de exportación nuclear (Cazalla *et al.*, 2002).

En tripanosomátidos se han identificado algunas NLS de tipo clásico y no canónico. En el caso de *T. brucei* se han encontrado 2 casos. El primero corresponde a la proteína ESAG8 cuya función es regular la expresión génica en la forma sanguínea del parásito, que porta una señal bipartita (Figura 11A) (Lips *et al.*, 1996; Hoek *et al.*, 2000). El segundo caso corresponde a la proteína La que funciona como una chaperona de los productos de transcripción de la RNA Pol III, tiene una señal monopartita (Figura 11B) (Marchetti *et al.*, 2000). En *T. cruzi* se han reportado cinco casos, el primero corresponde a la Histona H2B que funciona como componente estructural de la cromatina, y que porta una señal bipartita clásica (Figura 11C) (Marchetti *et al.*, 2000). El segundo caso corresponde a la proteína Met III que se expresa en formas metacíclicas, sin embargo, no se conoce su función, en su extremo amino porta una señal bipartita junto a un motivo de reconocimiento a RNA (RRM) que es fundamental para la importación nuclear de la proteína, mientras que en el extremo carboxilo de la proteína se encuentra otra señal bipartita (Figura 11D) (Gluezn *et al.*, 2007). El tercer caso corresponde a una proteína de unión a RNA llamada UBP1 que participa en la estabilización y degradación de mRNA, ésta porta una señal no canónica que recae en un RRM indispensable para su importación nuclear (Figura 11E) (Cassola y Frasch, 2009). El cuarto caso corresponde a un componente del espliceosoma llamado p14 que porta una señal monopartita en su extremo carboxilo, sin embargo, esta señal requiere de un RRM en el extremo amino para que la proteína se localice en el núcleo (Figura 11F) (Westergaard *et al.*, 2010). El último caso corresponde a la proteína adenilato ciclasa nuclear (ADKn) que está involucrada en la síntesis del nucleótido adenina, en su extremo amino porta una NLS no canónica compuesta de 89 residuos sin un consenso en particular (Figura 11G) (Cámara *et al.*, 2013).

En *Leishmania donovani* se han reportado 4 casos de proteínas con NLS, el primer caso corresponde a la topoisomerasa 2 (TOP2) que participa en el desdoblamiento del DNA duplex, esta proteína porta una NLS no canónica conformada de 61 residuos hacia su extremo carboxilo (Figura 11I) (Sengupta *et al.*, 2003). El segundo caso corresponde a Tdp1 cuya función es reparar los complejos estancados formados por la topoisomerasa tipo 1, esta

proteína porta una NLS no clásica conformada de 60 residuos en su extremo carboxilo (Figura 11K) (Banerjee *et al.*, 2010). La proteína ORC1 participa en el reconocimiento del origen de replicación y porta una NLS monopartita en su extremo amino (Figura 11L) (Kumar *et al.*, 2012). La proteína heterodimérica TopIB participa en el rompimiento de cadena sencilla en el DNA que presenta superhelicidad, en la subunidad mayor presenta una NLS no clásica conformada de 44 residuos hacia su extremo carboxilo (Figura 11M), mientras que en la subunidad menor presenta dos NLS no canónicas, hacia el extremo amino presenta una señal de 10 residuos y hacia su extremo carboxilo presenta otra de 28 residuos (Figura 11N) (Prada *et al.*, 2013). Finalmente, en *Leishmania major* solo se ha reportado el caso de la cinesina KIN13-1 que participa en la formación del huso mitótico durante la segregación cromosomal, ésta porta una señal no canónica de 43 residuos hacia su extremo carboxilo (Figura 11J) (Dubessay *et al.*, 2006). En la figura 11H se representa a la proteína RPA31 de *T. cruzi* con una NLS bipartita hacia su extremo carboxilo.

Existen programas informáticos que predicen posibles cNLS como son PSORTII y NLS mapper. Los algoritmos de predicción de estos programas están basados en las NLS registradas en levaduras, plantas y mamíferos (Nakai y Horton, 1999; Kosugi *et al.*, 2009b).

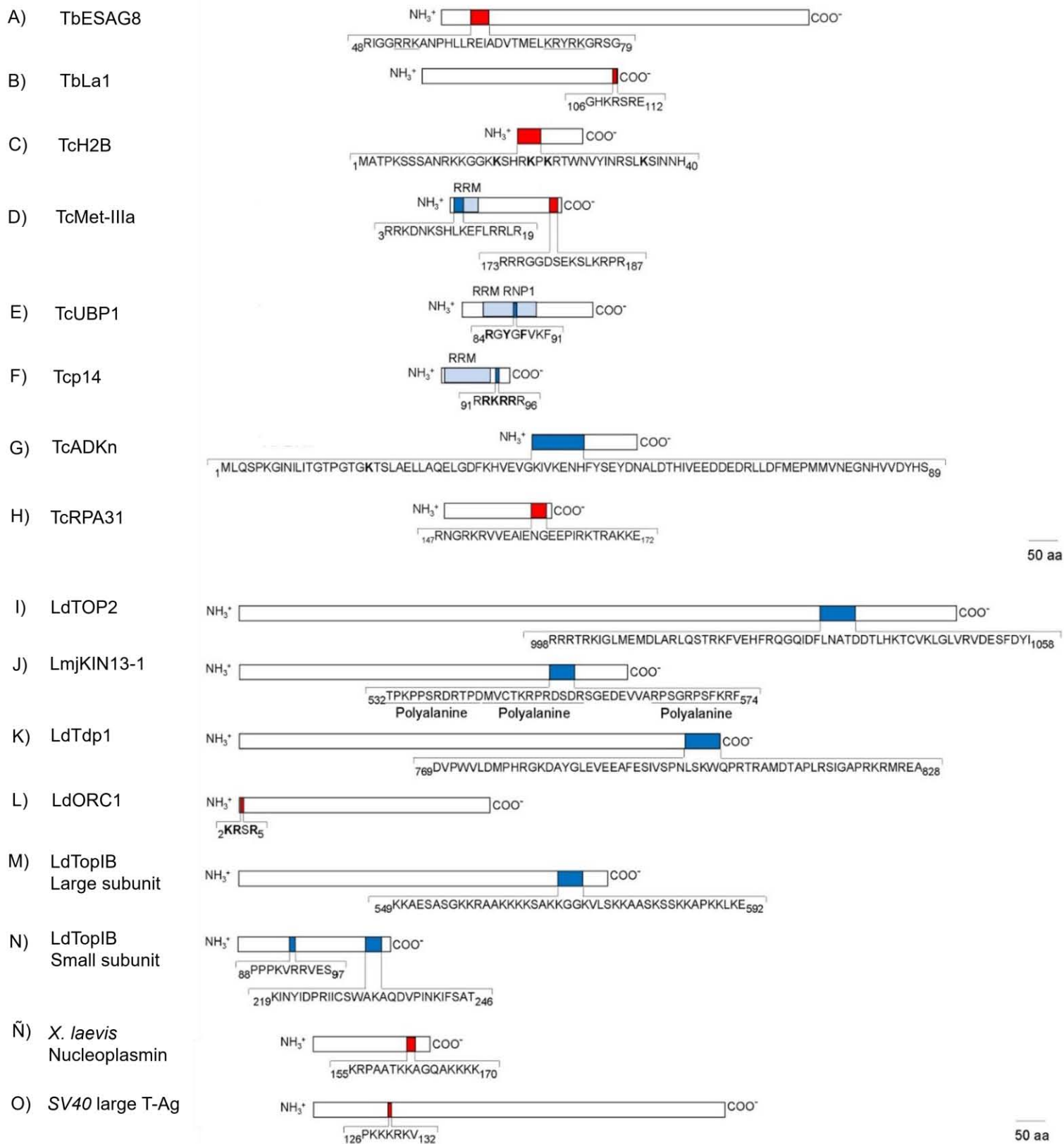


Figura 11 Representación esquemática de las proteínas nucleares de tripanosomátidos que presentan una NLS funcional. A-M) Ilustración de casos en el género *Trypanosoma* y el género *Leishmania*. En cada proteína se indica su NLS. Los aminoácidos resaltados en negrita son esenciales para el transporte nuclear de manera experimental. En el caso de ESAG8 dos regiones son subrayadas como potenciales elementos de una NLS bipartita. En la proteína LmjKIN13-1 tres bloques de polialanina fueron sustituidos en la región que corresponde a la NLS, resultando esenciales para el transporte nuclear. Las cajas rojas y azules representan NLS clásicas y NLS no clásicas respectivamente. Las cajas en azul claro representan motivos de reconocimiento a RNA (RRM). Ñ-O) Se indican las cNLS del antígeno mayor de SV40 y nucleoplasmina por ser las primeras en ser descritas como modelo de transporte nuclear (Tomado de Canela-Pérez *et al.*, 2019).

1.12 Importina α

La importina α es una proteína perteneciente a la familia de las carioferinas que participa como adaptador en la vía clásica de importación nuclear al reconocer cNLS de proteínas cargo (Goldfarb *et al.*, 2004; Oka y Yoneda, 2018). Presenta una estructura modular conformada por un extremo amino conocido como dominio de unión a importina β (IBB) y un extremo carboxilo conformado por 10 dominios Armadillo (ARM) (Cingolani *et al.*, 1999; Kobe, 1999). Los dominios ARM fueron inicialmente descritos en *D. melanogaster* en la proteína Armadillo y están compuestos por tres hélices α (H1, H2 y H3) (Riggelman *et al.*, 1989). La presencia continua de los dominios ARM genera una estructura conocida como alfa solenoide conformada por motivos hélice-giro-hélice (Fournier *et al.*, 2013). La rotación consecutiva entre los dominios ARM crea un surco a lo largo del eje de la superhélice de la proteína en donde se localizan los sitios de unión a las cNLS, específicamente los motivos conservados (\wedge R/K) XXWXXXN), en donde \wedge R/K es cualquier residuo a excepción de Arg o Lys (principalmente residuos ácidos o hidrofóbicos), mientras que X es cualquier aminoácido (Conti *et al.*, 1998; Conti y Kuriyan, 2000). Los residuos encargados de la interacción con la cNLS son principalmente residuos de Asn conservados que forman puentes de hidrógeno así como residuos de Trp que generan interacción con Arg y Lys mediante sus anillos indol (Fontes *et al.*, 2000). Las cNLS monopartitas y bipartitas se unen a los sitios de unión de importina α en una conformación extendida (Fontes *et al.*, 2003). Mediante análisis estructurales se ha demostrado que las NLSs monopartitas se unen preferencialmente al bolsillo mayor de importina α , mientras que las cNLS bipartitas se unen a los bolsillos menor y mayor de manera simultánea (Yang *et al.*, 2010). Adicionalmente se ha demostrado que mutaciones en el bolsillo mayor disminuyen la acumulación nuclear de NLS monopartitas, mientras que mutaciones en el bolsillo menor tienen un efecto menor (Kosugi *et al.*, 2009a; Yang *et al.*, 2010). Por otra parte, mutaciones en residuos de ambos bolsillos de manera simultánea interrumpen la unión de NLS bipartitas (Leung *et al.*, 2003). A la fecha, se ha logrado determinar la estructura tridimensional de la importina α de *Homo sapiens* (Dias *et al.*, 2009), *Saccharomyces cerevisiae* (Conti y Kuriyan, 2000), *Mus musculus* (Kobe, 1999; Fontes *et al.*, 2000), *Oryza sativa* (Chang *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2014), *Arabidopsis thaliana* (Wirthmueller *et al.*, 2015) y *Neurospora crassa* (Bernardes *et al.*, 2015). La

estructura de todas estas proteínas ortólogas comprende 10 dominios ARM que interaccionan con cNLS monopartitas y bipartitas (Chang *et al.*, 2013) (Figura 12).

Importina α no ha sido estudiada en tripanosomátidos, sin embargo, en la base de datos TriTrypDB se encuentran anotados los números de acceso de *T. cruzi* (TcCLB.509965.110 y TcCLB.509057.20, haplotipo Esmeraldo y haplotipo no Esmeraldo respectivamente), *T. brucei* (Tb927.6.2640) y *L major* (LmjF.30.1120).

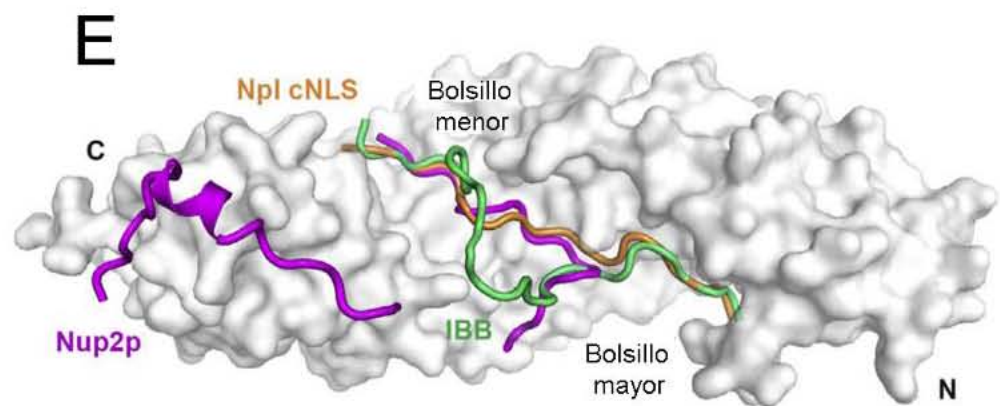
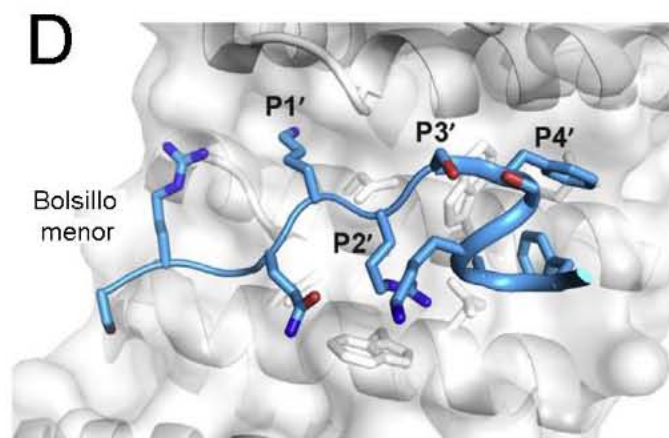
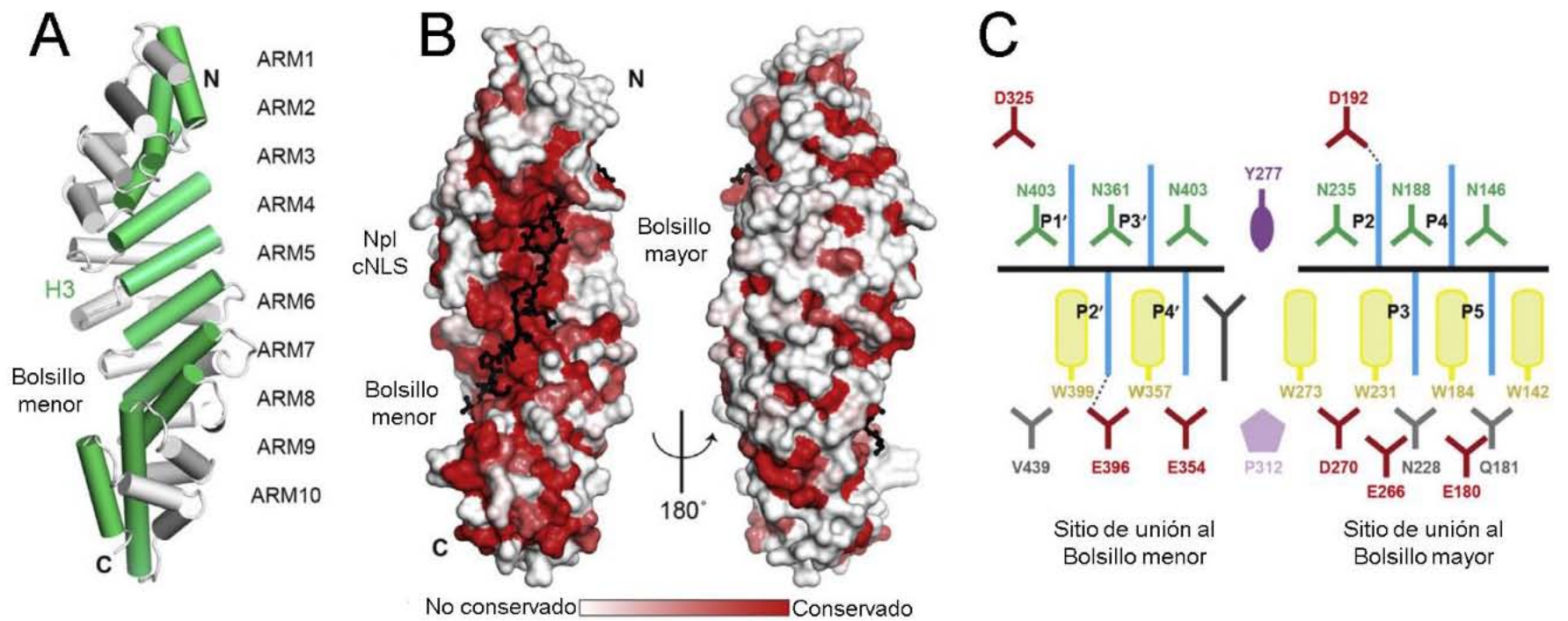


Figura 12 Estructura de importina α en unión con una cNLS. A) Estructura de importina α de *O. sativa* con la tercera hélice α de cada dominio ARM coloreadas en verde B) Estructura de importina α de *M. musculus* en interacción con la NLS bipartita de nucleoplasmina (mostrada en estructura de barillas negras). En rojo se resaltan las regiones conservadas al comparlarlas con importina α de *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *O. sativa*, *A. thaliana* y *N. crassa*. C) Representación esquemática de la unión de una NLS monopartita a los bolsillos mayor y menor de importina α . Los residuos de Asn y Trp se muestran en verde y amarillo respectivamente. Las cadenas principales y cadenas laterales de la NLS monopartita son mostradas como líneas negras y azules respectivamente. Las líneas discontinuas representan puentes salinos. D) Estructura del bolsillo menor de importina α de *M. musculus* en interacción la NLS de la proteína Gu α mostrada en azul. Los residuos de importina α comprenden el motivo (^R/K) XXWXXXN en los dominios ARM7 y ARM8. Los residuos de la NLS de Gu α que se unen al bolsillo menor se indican en las posiciones P1', P2', P3' y P4'. E) Estructura de importina α de *S. cerevisiae*, el dominio IBB se muestra en verde, la región de la nucleoporina Nup2p que interacciona con importina α se indica en purpura. La NLS bipartita de nucleoplasmina se muestra en verde. (Tomado y modificado de Christie *et al.*, 2016).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas sigue siendo un problema de salud pública actualmente en América latina, Estados Unidos y Europa. Es necesario encontrar y proponer nuevos blancos quimioterapéuticos para combatir esta enfermedad, por lo que el estudio de la proteína TcRPA31 resulta relevante al tratarse de una proteína esencial y específica de tripanosomátidos. Actualmente el estudio de transporte nucleocitoplásmico en tripanosomátidos es escaso, por lo que este estudio aportará bases importantes para entender el mecanismo de importación de proteínas por la vía clásica.

3. OBJETIVO

Estudiar el papel de los componentes involucrados en la importación al núcleo de la subunidad TcRPA31 del complejo proteico de la RNA Polimerasa I de *T. cruzi*.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar los niveles de expresión y evaluar la distribución celular de la proteína de fusión RPA31-EGFP en diferentes condiciones de proliferación celular. Esto es, fase exponencial y fase estacionaria.
2. Determinar la región responsable de la importación nuclear de TcRPA31.
3. Evaluar la posible interacción entre TcRPA31 y TcImportina α *in vivo* e *in vitro*.
4. Averiguar la posible vía de importación nuclear de TcRPA31 con la droga ivermectina.
5. Evaluar la expresión y localización subcelular de TcImportina- α en condiciones de crecimiento y diferenciación.
6. Evaluar la interacción entre la señal de localización nuclear de TcRPA31 y TcImportina- α .
7. Determinar la región que participa en la interacción entre la NLS de TcRPA31 y TcImportina α .
8. Evaluar el efecto de ivermectina en la interacción entre la NLS de TcRPA31 y TcImportina α .
9. Predicción *in silico* de señales de localización nuclear en proteomas nucleares de *T. cruzi* y *T. brucei* para generar secuencias consenso de importación nuclear en tripanosomas.
10. Evaluar si el dominio IBB de TcImportina- α es necesario para su localización nuclear.

4. HIPÓTESIS

De manera canónica en eucariontes las señales de importación nuclear están enriquecidas con aminoácidos básicos, por lo que la delección de regiones conteniendo estos residuos permitirá el mapeo de una posible señal de localización nuclear de la proteína TcRPA31. Además, por predicciones informáticas RPA31 porta una posible señal de localización nuclear de tipo bipartita en su extremo carboxilo. Esta posible NLS bipartita podría interactuar con proteínas que participan en la vía clásica de importación de proteínas α/β .

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivos del parásito

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa de referencia CL Brener (TINF/BR/1963/CL-Brener) se mantuvieron en medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptone Medium) (Camargo, 1964), complementado con suero fetal bovino al 10% e inactivado, penicilina [100 U/mL], estreptomycin [100 mg/mL] y hemina a una temperatura de 28°C. El conteo celular se realizó en cámara de Neubauer. En el sistema experimental usado y para fines de reproducibilidad, cosechamos a los parásitos tanto en fase exponencial de crecimiento (densidad poblacional entre 20 a 30 x 10⁶ células/mL) como en fase estacionaria, considerada operacionalmente cuando la densidad de células no aumenta en 72 h, típicamente entre 80-100 x 10⁶ células/mL. Para las pruebas de inhibición de la importación se usó ivermectina (Sigma-Aldrich, 18898) a [25 µM] en cultivos con una densidad poblacional de 20 X 10⁶ cel/mL.

5.2 Amplificación de ácidos nucleicos por PCR

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: a cada reacción se le agregó 1 µL (100 µM) del oligonucleótido en sentido más 1 µL (100 µM) del oligonucleótido reverso y 1 µL (220 ng) de templado. Además, a cada reacción se le agregaron 5 µL de amortiguador HIFI PCR 10X (Invitrogen), 1.5 µL MgSO₄ (50 mM), 1 µL Taq polimerasa (Invitrogen), 1 µL de dNTPs (10 mM) y 38.5 µL de agua bidestilada para alcanzar un volumen final de 50 µL.

El programa seguido por el termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) para la reacción de PCR consistió en 7 pasos; una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C (Paso 1), seguida por otra desnaturalización corta de 30 segundos a 94 °C (Paso 2), renaturalización por 30 segundos a 67 °C (Paso 3), una extensión a 68 °C por 1 min (Paso 4), se repitieron los pasos 2 al 4 por 29 veces (Paso 5), una extensión final de 68 °C por 10 min (Paso 6), y un enfriamiento a 4 °C (Paso 7).

Tabla II Construcciones de TcRPA31 y TcImportina α

Plásmido	Oligonucleótidos		Características
pTEX-EGFP ¹	F R	5'-ATCGATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3' 5'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'	Región codificante de EGFP subclonada en el plásmido pTEX
pRPA31-EGFP ²	F R	5'-GAATTCGATGAAGCTGGTGAAGTTTGTGAATTG-3' 5'-ATCGATTTGTGCTTCTTTGACCCACCGTTG-3'	Expresa aa 1-184 de RPA31 (ORF completo) fusionada a EGFP
pRPA31- Δ C-EGFP ²	F R	5'-GAATTCATGAAGCTGGTGAAGTTTGTG-3' 5'-ATCGATCCTTCCTTCTTTGCACGTGTC-3'	Expresa aa 1-172 de RPA31 fusionada a EGFP
pRPA31 Δ 1/2B+C-EGFP ²	F R	5'-GAATTCATGAAGCTGGTGAAGTTTGTG-3' 5'-ATCGATGCTGTCTTACGGATCGGTTCCCTCAC-3'	Expresa aa 1-167 de RPA31 fusionada a EGFP
pRPA31 Δ B+C-EGFP ²	F R	5'-GAATTCATGAAGCTGGTGAAGTTTGTG-3' 5'-ATCGATCCTTCCTCACCGTTTCAATCG-3'	Expresa aa 1-162 de RPA31 fusionada a EGFP
pBipNLS-EGFP ³	F R	5'-AAGCTTATGAGGAACGGGCGAAAACGTGTCGTG-3' 5'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'	Expresa aa 147-172 de RPA31 fusionada a EGFP
pRPA31 Δ A +espaciador-EGFP ⁴	F R	5'-AAGCTTATGCCGATCCGTAAGACACGTG-3' 5'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'	Expresa aa 163-184 de RPA31 fusionada a EGFP
pTcA31S	F R	5'-ATGAAGCTGGTGAAGTTTGTG-3' 5'-TCAGTGCTTCTTTGACCCACC-3'	El ORF completo de RPA31 clonado en el vector pGEM T easy.
pImportina- α -GEM pImportina- α -6xHis pImportina- α -6xHis- TEX	F R	5'-CCATGGGATTCGGTGGGCAAGGC -3' 5'-AGATCTAAAGTCAAATTCCGTGTCTTGTTCGC -3'	El ORF completo de TcImportina- α clonado en el vector pGEM T easy. Esta secuencia fue subclonada en el vector pQE60 (que agrega el tag de 6xHis en el extremo carboxilo). Finalmente, la secuencia Importina- α -6xHis fue subclonada en el vector pTEX (vector de expresión en Tripanosomátidos)
pImportina- α -EGFP ⁵	F R	5'- GAATTCATGTTTCGGTGGGCAAGGCGAG -3' 5'- ATCGATGCAAAGTCAAATTCCGTGCCTTG -3'	Expresa aa 1-533 de TcImportina- α (ORF completo) fusionado a EGFP
pImportina- α - Δ IBB- EGFP	F R	5'- GAATTCATGGACGCGGTGATCAAGAGTGG -3' 5'- AAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG -3'	Expresa aa 119-533 de RPA31 fusionada a EGFP
pRPA31-EGFP-QE60 *	F R	5'- CCATGGGGAAGCTGGTGAAGTTTGTGAATTGTG - 3' 5'- AAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG -3'	Expresa aa 1-184 de RPA31 (ORF completo) fusionada a EGFP
pBipNLS-EGFP-QE60 *	F R	5'- CCATGGGCAGGAACGGGCGAAAACGTG -3' 5'- AAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG -3'	Expresa aa 147-172 de RPA31 fusionada a EGFP

pBipNLSΔ1/2B-EGFP ⁶ *	F R	5'- CCATGGGCAGGAACGGGCGAAAACGTG -3' 5'- AAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG -3'	Expresa aa 147-167 de RPA31 fusionada a EGFP
pBipNLSΔB-EGFP ⁷ *	F R	5'- CCATGGGCAGGAACGGGCGAAAACGTG -3' 5'- AAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG -3'	Expresa aa 147-162 de RPA31 fusionada a EGFP
pEGFP-QE60 *	F R	5'- CCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC -3' 5'- AAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG -3'	Expresa la región codificante de EGFP

¹ La región codificante de EGFP se subclonó del vector pRH006 (BCCM/LMBP, Technologiepark-Zwijnaarde, Belgium) en el plásmido pTEX entre los sitios de restricción *Cla I* / *Xho I*.

² Estas regiones codificantes de RPA31 se amplificaron del vector pGEM-T easy e insertaron en el plásmido pTEX-EGFP entre los sitios de restricción *EcoR I* / *Cla I*

³ Esta región codificante de RPA31 se amplificó de pRPA31-ΔC-EGFP e insertó en el plásmido pTEX entre los sitios de restricción *Hind III* / *Xho I*

⁴ Esta región codificante de RPA31 se amplificó de pRPA31-EGFP e insertó en el plásmido pTEX entre los sitios de restricción *Hind III* / *Xho I*

⁵ La secuencia codificante de TcImportina-α se insertó en el plásmido pTEX-EGFP entre los sitios de restricción *EcoR I* / *Cla I*.

⁶ Esta región codificante de RPA31 se amplificó de pRPA31Δ1/2B+C-EGFP (Canela Pérez *et al.*, 2018).

⁷ Esta región codificante de RPA31 se amplificó de pRPA31ΔB+C-EGFP (Canela Pérez *et al.*, 2018).

- Cada una de las fusiones con EGFP se clonaron entre los sitios *NcoI* / *Hind III* en el plásmido pQE60 sin la secuencia codificante de 6xHis.

5.3 Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

Se siguió el protocolo recomendado en Sambrook y Russell (2001) que se resume a continuación: se cultivaron células de *E. coli* (JM109) en una caja de Petri con agar LB (triptona 0.1 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.1 %) (Bertani y Weigle, 1953) y se sembraron cada 24 horas durante 3 días. Se tomó una de las colonias y se inoculó en 3 mL de medio LB, las células se incubaron toda una noche a 37 °C. Posteriormente se tomaron 100 µL del inóculo y se colocaron en un matraz con 30 mL de LB y 300 µL de sales (MgCl₂ 3.0 mM y MgSO₄ 3.0 mM). El cultivo se incubó a temperatura ambiente y en agitación, cuando el cultivo llegó a una D.O._{600 nm} = 0.6, el matraz se colocó en hielo durante 10 min, posteriormente se centrifugó a 1620 x g (Centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180, 3000 rpm) por 10 min a 4 °C, el botón celular se resuspendió en 2.4 mL de amortiguador TB (PIPES 0.3 g, CaCl₂·2H₂O 0.22 g, KCl 1.86 g, MnCl₂ 1.09 g, pH 6.7) con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 7.0 % e incubando en hielo por 10 min. Finalmente, la suspensión se vertió en tubos Eppendorf fríos de 200 µL y se congelaron inmediatamente sumergiéndolos en hielo seco con etanol. Para almacenar las células, se guardaron a -70 °C.

5.4 Clonación de productos amplificados en el vector pGEM-T-easy y transformación de células competentes

Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T-easy (Promega), los insertos clonados se evaluaron con enzimas de restricción que realizan cortes en la región de multiclonación de pGEM-T-easy. Las condiciones de clonación se resumen a continuación: a cada reacción se le agregaron 5 µL de amortiguador 2X rapid ligation (Promega), 1 µL del vector pGEM-T-easy (50 ng), 1 µL de los productos de PCR, 1 µL de T4 DNA ligasa (Promega) y 2 µL de agua bidestilada. Posteriormente las reacciones se incubaron toda una noche a 4 °C.

Para transformar las células competentes con los productos clonados, se agregaron 50 ng de las reacciones de ligación junto con 200 µL de células competentes en tubos Eppendorf estériles y se dejaron en hielo durante 30 min, posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C durante 45 s y rápidamente se transfirieron a hielo durante 1 min. A cada tubo con

células se le adicionaron 800 μ L de medio SOB (bacto-triptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.05 %) más glucosa a una concentración final de 20 mM y se incubaron durante 50 min a 37 °C. Las células se sembraron en cajas de Petri con medio LB-Agar y ampicilina [100 μ g/mL], con la finalidad de seleccionar clonas de bacterias transformadas, además se agregó IPTG [0.5 mM] y X-Gal [80 μ g/mL] para facilitar la selección de colonias transformadas con el vector que contiene el inserto de interés. Finalmente se incubaron toda una noche a 37 °C.

Al día siguiente se seleccionaron algunas clonas al azar (colonias blancas) y se cultivaron en medio LB con ampicilina para determinar si las colonias contenían el plásmido con los insertos clonados.

5.5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina

Se escogieron colonias bacterianas al azar y se inocularon en 3 mL de medio LB con ampicilina [100 μ g/mL] dejándolas crecer una noche a 37 °C. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 18400 x g (Centrífuga 5424, Eppendorf, 14000rpm) durante 30 segundos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 100 μ L de solución de suspensión fría (glucosa 500 mM, Tris-HCL a pH 8.0 25 mM y EDTA 10 mM, pH 8) por 5 min, después se agregaron 200 μ L de solución de lisis recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS 1%) mezclando 10 segundos por inversión y manteniendo en hielo.

Inmediatamente después se adicionaron 150 μ L de solución neutralizante fría (acetato de potasio [5.0 M], ácido acético glacial al 10 %), mezclando por inversión durante 10 segundos y manteniendo en hielo por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se realizaron dos extracciones, la primera con un volumen de la mezcla fenol: cloroformo (1:1) y la segunda con un volumen de cloroformo, con dos centrifugaciones entre cada extracción de 5 min a 18400 x g. El DNA plasmídico se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto a una temperatura de -70 °C por 20 min, posteriormente se centrifugó a 18400 x g por 10 min y se retiró el sobrenadante, el botón se lavó con etanol al 70 % y se dejó secar por 2 min a temperatura ambiente, finalmente el DNA se resuspendió en 100 μ L de TE con RNasa (Tris [10 mM] pH 7.4, EDTA [0.2 mM] pH 7.2, RNasa [20 μ g/mL]), las muestras se incubaron a 37°C por 1 h y se almacenaron a -20 °C.

5.6 Construcciones plasmídicas

Los marcos de lectura abiertos de TcRPA31 haplotipo esmeraldo (TcCLB.510311.110) y TcImportina- α haplotipo esmeraldo (509965.110) se amplificaron a partir de DNA genómico y se clonaron dentro del vector pGEM T-easy (Promega). Los amplicones se subclonaron dentro del vector de expresión en tripanosomátidos pTEX (Kelly *et al.*,1992) entre los sitios *EcoR* I y *Cla* I, conteniendo el gen codificante de la proteína verde fluorescente (pTEX-EGFP), para su subsecuente expresión como proteínas de fusión TcRPA31-EGFP y TcImportina- α -EGFP. Se construyó una serie de versiones escindidas de ambas proteínas de fusión que se especifica de manera detallada en la Tabla I. Las ligaciones se hicieron en un tubo Eppendorf de la siguiente manera: se agregó 1 μ L de amortiguador T4 ligasa 10X, 1 μ L (3U) de T4 DNA ligasa (Promega), 1 μ L (300 ng) de pTE digerido, 2 μ L (900 ng) del producto de PCR purificado y digerido previamente y 5 μ L de agua mili Q, finalmente se incubó 18 h a 14 °C. Todas las secuencias se verificaron por secuenciación.

5.7 Transfección de *T. cruzi*

Se dejó crecer un cultivo de epimastigotes hasta que alcanzara la fase de crecimiento exponencial, fueron necesarios 3×10^8 epimastigotes (30 mL de medio de cultivo LIT, a una densidad poblacional inicial de 1×10^6 células/mL e incubados entre 4 y 5 días). Los epimastigotes se cosecharon a 800 x g (centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180, 2100 rpm) por 10 min y se lavaron con 30 mL de medio LIT no complementado (sin suero y sin hemina) preenfriado a 4°C. Después de lavadas las células se centrifugaron a 800 x g por 10 min. Posteriormente se resuspendieron en 350 μ L de medio LIT sin complementar y se les adicionó 50 μ g de DNA de plásmido purificado con el Kit de extracción plasmídica de QIAGEN (todo en hielo). Se transfirió a celdas para electroporación utilizando la pipeta Pasteur que viene con las celdillas y se incubaron en hielo por 5 min. Posteriormente se prendió el equipo durante los 5 min de incubación (BTX ECM 830) y se fijaron las condiciones de electroporación a 360 V 1500 μ F 13 Ohms 12 milisegundos. La transfección se realizó verificando que los valores de capacitancia cayeran entre 8 y 9. Después de la transfección se dejaron reposar a temperatura ambiente 5 min y se recuperaron las células de la celda con pipeta de Pasteur y se transfirieron a un frasco para su incubación. Se recuperó

el mayor número de células con varios lavados de la celda con medio LIT complementado y resuspendiéndolas. Las células se sembraron en 10 mL de medio LIT complementado y se incubaron por 24 h a 28°C. Se realizó la cuenta de parásitos con un rango cercano de $1-2 \times 10^8$ células/mL y se realizó una dilución 1:5 (1 mL de células más 4 mL de medio) en medio fresco con G418 (Sigma-Aldrich, A1720) a [300 µg/mL] para las transfecciones con el vector pTEX. Después de incubar por ~20 días los parásitos no resistentes dejaron de dividirse por completo y se observaron como células redondas sin flagelo, mientras que los parásitos seleccionados se agruparon en conglomerados celulares que comenzaron a liberarse aproximadamente al día 30.

5.8 Microscopía de fluorescencia

Epimastigotes en fase de crecimiento exponencial transfectados con RPA31-EGFP se centrifugaron a 3000 x g (Centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180) por 5 min, se lavaron con un volumen de amortiguador fosfato salino (PBS) 1X, nuevamente se centrifugaron y el sobrenadante se desechó. El botón celular se resuspendió suavemente en paraformaldehído al 3.7 % en PBS 1X, llevando a una densidad de 40×10^6 células/mL. Se incubaron por 10 min a 4°C para fijar las células. En un portaobjetos silanizado se dibujaron círculos con plumón hidrofóbico y se colocaron 100 µL de la suspensión de células fijadas. Se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Las células no unidas se lavaron sumergiendo los portaobjetos en PBS 1X y en agitación gentil durante 10 min. Las células se incubaron con DAPI (Sigma-Aldrich) [5 µg/mL] (DAPI se une a los surcos menores del DNA principalmente a las regiones ricas en adenina y timina, sin embargo, en tripanosomátidos también se une al DNA mitocondrial, por lo que se observa la fluorescencia del núcleo y el cinetoplasto). Las muestras se montaron con medio de montaje Dako fluorescent mounting médium (Dako). Las células se observaron por microscopía de fluorescencia usando un filtro que permite la excitación de la muestra a 450-488 nm y emite a 510 nm (verde). Las células transfectadas con TcImportina- α -6xHis se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.5% durante 10 minutos, posteriormente se bloquearon con albúmina al 2% en PBS durante 16 horas a 4°C. Se procedió a montar las muestras y se incubaron con el anticuerpo primario comercial anti-6xHis (GeneTex) (1:5000 v/v) por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X (5 minutos cada lavado) y se incubaron con el anticuerpo

secundario acoplado a Alexa 594 anti-conejo (Life Technologies) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados y se procedió a incubar con DAPI. Las muestras se observaron por microscopía de fluorescencia usando un filtro que permite la excitación de la muestra a 590nm y emite a 617 nm (rojo) en un microscopio Olympus BX51.

5.9 Inmunoréplica tipo Western Blot

Se obtuvieron lisados totales de epimastigotes de la siguiente manera: se centrifugaron parásitos en fase exponencial y fase estacionaria a 1620 x g (Centrífuga Beckman de mesa, rotor de columpio S4180) a 4 °C, se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS 1X y se centrifugaron a 1620 x g por 10 min. Las células se centrifugaron y se decantó el sobrenadante para realizar un conteo de parásitos, posteriormente se agregaron 10 µL de amortiguador de lisis por cada 5×10^6 células, el lisado se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se calentó a 95 °C por 5 min. Finalmente, las muestras se guardaron a -20 °C.

Las proteínas presentes en el lisado total de parásitos se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de 0.45 µm PVDF Immobilon-P (Merk Millipore, Darmstadt, Germany) de acuerdo con los protocolos estándar. La membrana se bloqueó con 0.05 % de Tritón X- 100 en PBS (PBS-T) con 5 % de leche descremada toda la noche a 4°C en agitación gentil. La membrana se incubó por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario comercial anti-EGFP (Clontech, 632569), anti-6xHis (GeneTex, GTX115045) (1:5000 v/v), anti-alfa tubulina (abcam, ab4074), anti-aldolasa de Plasmodium (abcam, 207494) (1:500 v/v) (la tubulina y aldolasa se usaron como controles de carga), diluidos por separado en PBS con 2 % de leche descremada. Posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBS-T (30 min por lavado) y entonces se incubó por 1 h con el anticuerpo secundario de cabra contra IgG de ratón (Pierce, 31430) o IgG de conejo (Pierce, 31460) conjugados con peroxidasa de rábano picante (1: 30,000 v/v), diluido en PBS-T con 2 % de leche descremada. La membrana se lavó tres veces con PBS-T (3 min por lavado), incubada en SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific, 34577) y se sometió al revelado.

5.10 Ensayos de interacción

Para los ensayos de interacción *in vivo* se creció un cultivo de epimastigotes cotransfectados con TcRPA31-EGFP y TcImportina- α -6xHis y como control se usaron parásitos que expresaran solamente RPA31-EGFP hasta que alcanzaran la fase de crecimiento exponencial; las células se seleccionaron con G418 [300 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Se cosecharon 10×10^8 parásitos y se les agregó 1 mL de amortiguador de lisis (Tritón al 1% en PBS con una tableta de inhibidores de proteasas “complete ultra tablets” Roche), y una unidad de nucleasa benzonasa en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, el lisado se centrifugó a 14,000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. El lisado de parásitos se incubó con 400 μL de perlas de Ni-NTA-agarosa (QIAGEN,30230) durante 1 hora a temperatura ambiente (~ 23 °C). Las perlas se centrifugaron a 400 x g durante 2 minutos y se lavaron 4 veces con 1500 μL de amortiguador de lavado ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ [50 mM], NaCl [300mM], Imidazol [20 mM], pH 8), se hizo un quinto lavado con 300 μL y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, las perlas se incubaron con 300 μL de amortiguador de elución ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ [50 mM], NaCl [300mM], imidazol [250 mM], pH 8); durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación constante, las perlas se centrifugaron a 400 x g durante 2 minutos y el sobrenadante se recuperó para evaluarse por Western blot.

Para realizar los ensayos de interacción *in vitro* se crecieron cultivos de la cepa M-15 que expresaran las proteínas recombinantes TcRPA31-EGFP, NLS-EGFP, EGFP, TcImportina- α -6xHis y versiones escindidas de la NLS de TcRPA31 hasta que alcanzaran una D.O. de 0.6 en medio LB con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y kanamicina [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Las células se indujeron con IPTG [1 mM] durante dos horas a 37 °C en agitación constante y se cosecharon a 400 x g durante 20 minutos, posteriormente el sobrenadante se decantó. El botón celular se resuspendió en 4 mL de amortiguador de lisis ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ [50 mM], NaCl [300mM], imidazol [10 mM], pH 8) y una unidad de nucleasa benzonasa (Sigma-Aldrich) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, el lisado se centrifugó a 14,000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. En tubos de 5 mL se incubaron 400 μL de perlas de Ni-NTA-Agarosa (Invitrogen) con 2 mL de lisado de TcImportina- α -6xHis seguido de la adición individual de 2 mL de cada uno de los lisados bacterianos que se indican a continuación: EGFP, TcRPA31-EGFP, BipNLS-EGFP, BipNLS Δ B-EGFP y

pBipNLS Δ 1/2B-EGFP. Los lavados y la elución se hicieron exactamente igual a los ensayos de interacción *in vivo*. La ivermectina se utilizó a una concentración de [250 μ M].

5.11 Análisis *in silico*

La búsqueda de secuencias proteicas que conforman los proteomas nucleares reportados de *T. brucei* y *T. cruzi* se hicieron en la base de datos Tritypdb.org. La predicción de señales de localización nuclear se realizó con el programa PSORT II (Nakai y Horton, 1999) y posteriormente se generaron logos de frecuencia con el programa Weblogo (Crooks *et al.*, 2004). Para hacer los alineamientos de secuencias se usó el programa CLUSTAL OMEGA, mientras que la predicción de dominios y estructura secundaria de proteínas se hicieron con los programas Pfam (El-Gebali *et al.*, 2019), InterPro (Quevillon *et al.*, 2005) y PHYRE2 (Kelley *et al.*, 2015).

6. RESULTADOS

6.1 Expresión y localización celular de RPA31-EGFP en el crecimiento y la diferenciación a metacicloogénesis

En estudios previos de nuestro grupo se ha observado que el nucléolo de epimastigotes de *T. cruzi* en crecimiento exponencial es de mayor tamaño que el de células en fase estacionaria (Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2010). Este fenómeno está relacionado con una mayor actividad de biogénesis ribosomal en crecimiento exponencial necesario para la síntesis de proteínas en un ambiente rico en nutrientes. Se ha descrito que epimastigotes en crecimiento estacionario pueden dar lugar a formas no replicativas de tripomastigotes metacíclicos que corresponde a la fase infectiva en el ciclo de vida de *T. cruzi* (Camargo 1964; Hernández *et al.*, 2012). En relación con esto, quisimos evaluar si existía alguna variación tanto en los niveles de expresión como en la localización subcelular en condiciones de crecimiento cuando los nutrientes son abundantes, fase estacionaria como una etapa preadaptativa a metacicloogénesis y finalmente en tripomastigotes metacíclicos transfectados con TcRPA31-EGFP. La localización subcelular de RPA31-EGFP en fase de crecimiento exponencial es nuclear, con un arreglo característico del nucléolo (Figura 13A-B). En los epimastigotes de fase estacionaria se observa una distribución granular extendida en el nucleoplasma, incluso este patrón de fluorescencia se observó en el núcleo alargado de tripomastigotes metacíclicos (Figura 13C-F). Evaluamos la acumulación de TcRPA31-EGFP (~49 kDa) en lisados de parásitos (Figura 14A) y observamos que los niveles de proteína del crecimiento exponencial y estacionario son similares (Figura 14B).

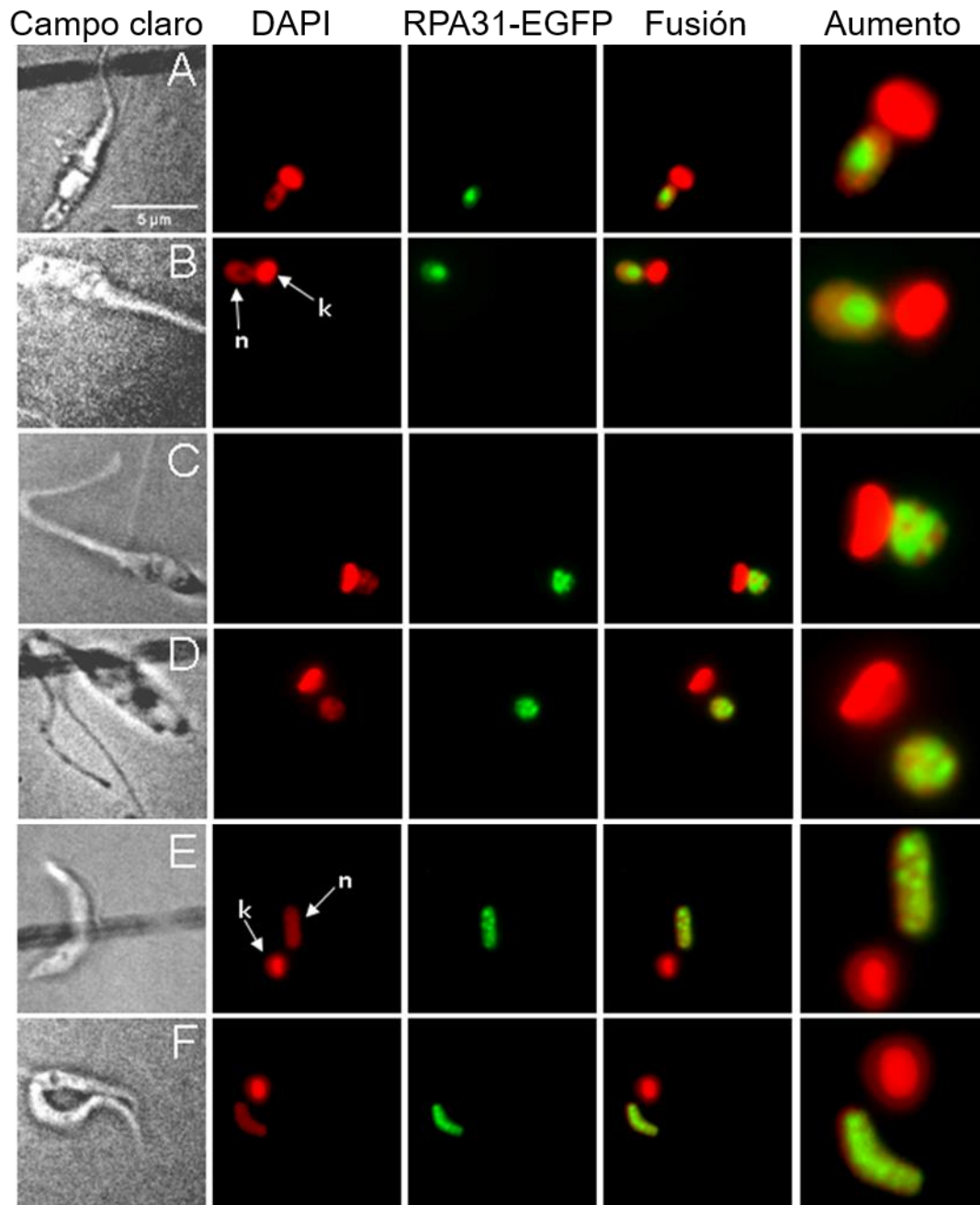


Figura 13 Localización subcelular de TcRPA31-EGFP. (A, B) Imágenes representativas de epimastigotes en crecimiento exponencial, (C, D) epimastigotes en fase estacionaria y (E, F) tripomastigotes metacíclicos. Se muestran diferencias en la distribución de fluorescencia. Se indica el núcleo (n) y el cinetoplasto (k).

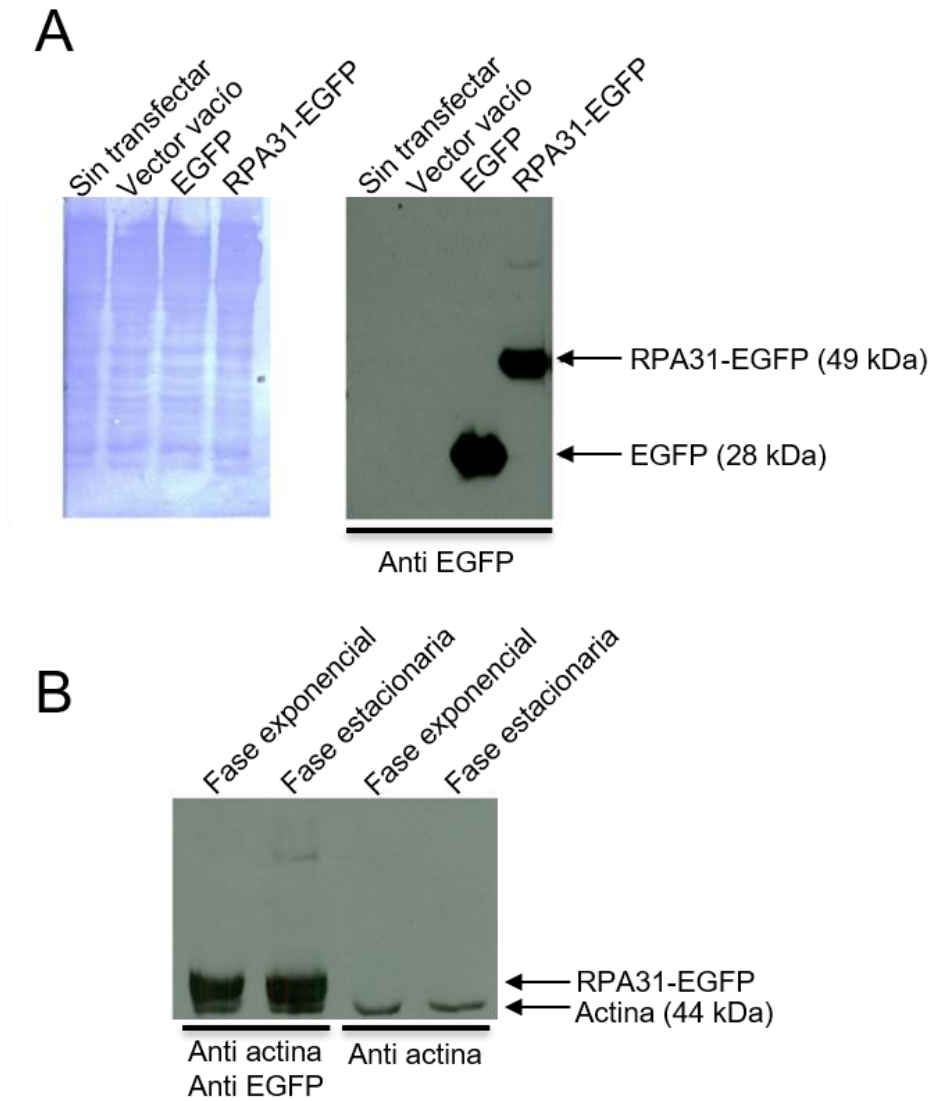


Figura 14 Expresión de la proteína de fusión TcRPA31-EGFP. A) Se observa la acumulación de TcRPA31 y EGFP en lisados de epimastigotes transfectados y evaluados por Western blot. Lisado de parásitos silvestres y transfectados con el vector vacío se usaron como controles negativos. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se tiñeron con azul de Coomasie como control de carga (Izquierda), los mismos extractos proteicos se probaron con anti-EGFP (Derecha). B) Lisados de parásitos transfectados con TcRPA31-EGFP y cosechados en crecimiento exponencial y estacionario se probaron con una mezcla de anti EGFP y anti-TcActina (suero policlonal). Los mismos lisados se incubaron únicamente con anti-TcActina como control de carga.

6.2 Identificación *in silico* de la señal de localización nuclear potencial de TcRPA31

Desde que RPA31 se identificó en *T. brucei*, se observaron similitudes reconocibles solo con proteínas de tripanosomátidos. Con la finalidad de hacer un análisis comparativo entre secuencias proteicas ortólogas de TcRPA31 de cinetoplástidos, se realizó la búsqueda de secuencias mediante un análisis BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y posteriormente cada secuencia obtenida se buscó en la base de datos TritrypDB (tritrypdb.org/tritrypdb/). Para ver la similitud entre las secuencias se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTAL OMEGA. La longitud de las secuencias se asemeja más entre *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *T. rangeli*, *T. grayi* y *T. cruzi* que tienen un intervalo entre 178 a 194 aa, mientras que la excepción corresponde a *T. brucei* con 226 aa. Por otra parte, también se realizó un análisis individual de cada secuencia ortóloga para predecir alguna posible señal de localización nuclear con los programas PSORT II y NLS mapper. Estos programas indicaron una señal de localización nuclear de tipo bipartita en cada una de las secuencias analizadas. Los dos haplotipos de *T. cruzi* presentan un cambio de residuo en la señal de localización nuclear en el aminoácido 169 (Figura 15).

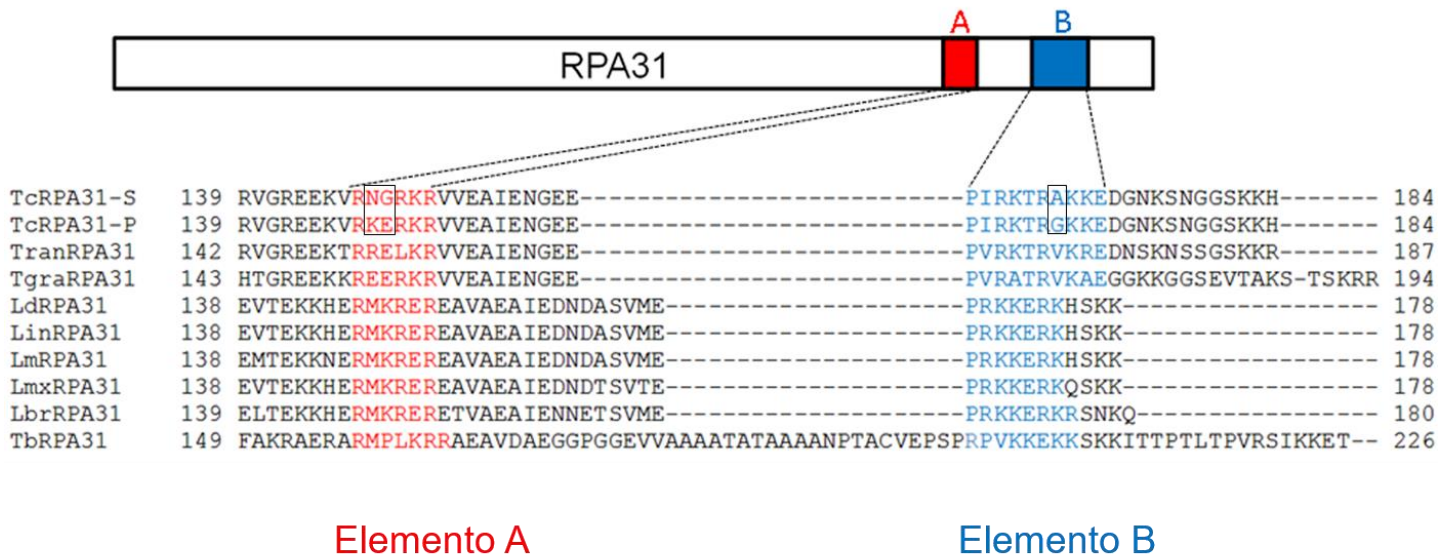


Figura 15 Potencial señal de localización nuclear conservada en RPA31 de tripanosomátidos. Alineamiento esquemático entre proteínas ortólogas de RPA31. La región coloreada dentro de cajas representa la posición del elemento que contiene una señal de localización nuclear clásica (de tipo bipartita). Su asignación como elemento A y elemento B es arbitraria. Los residuos encerrados en cajas cuadrículas indican la diferencia de aminoácidos entre las secuencias de las NLS en los dos haplotipos de *T. cruzi*. El número de acceso de cada una de las secuencias corresponde a los anotados en la base de datos TritrypDB. *Trypanosoma cruzi*: TcRPA31-S (Esmeraldo haplotype), TcCLB.510311.110, TcRPA31-P (non-Esmeraldo haplotype), TcCLB.508153.1140; *Trypanosoma rangeli*: TranRPA31, TRSC58_02635; *Trypanosoma grayi*: TgraRPA31, DQ04_00041120; *Leishmania donovani*: LdRPA31, LdBPK_030560.1; *Leishmania infantum*: LinRPA31, LinJ.03.0560; *Leishmania major*: LmRPA31, LmjF.03.0580; *Leishmania mexicana*: LmxRPA31, LmxM.03.0580; *Leishmania braziliensis*: LbrRPA31, LbrM.03.0490; and *Trypanosoma brucei*: TbRPA31, Tb927.10.3540.

6.3 Disección funcional de la señal de localización nuclear de TcRPA31

Para probar si la NLS bipartita predicha *in silico* era funcional procedimos a generar una serie de versiones escindidas de TcRPA31 fusionadas a EGFP y evaluar su localización celular por microscopía de fluorescencia. La señal de fluorescencia de parásitos transfectados con EGFP como control, se extiende a lo largo del cuerpo celular (Figura 16A). Contrastantemente, la proteína de fusión TcRPA31-EGFP se localizó claramente en el núcleo como se muestra en la Figura 16B. Doce aminoácidos del extremo C-terminal de TcRPA31 pueden ser eliminados sin ninguna influencia aparente en su localización nuclear (Figura 16C). Si el pentapéptido RAKKE del elemento B es eliminado se presenta una ligera señal de fluorescencia en el citoplasma (Figura 16D). La eliminación del elemento B genera una localización citoplasmática de la proteína (Figura 16E). Sin embargo, cuando el elemento A, la región espaciadora y el elemento B son fusionados a la proteína EGFP, se observa claramente la fluorescencia en el núcleo (Figura 16F). Finalmente, cuando solo el elemento B y la región corta del extremo C-terminal de TcRPA31 se fusionan a EGFP, la fluorescencia es principalmente nuclear, con una ligera fluorescencia en citoplasma (Figura 16G). Los patrones de localización celular de TcRPA31-EGFP apoyan fuertemente que la región de 26 aminoácidos es una señal de localización nuclear clásica de tipo bipartita. Dentro de esta secuencia, el elemento B parece ser esencial, mientras que el elemento A más la región espaciadora juegan un papel menos significativo en la localización nuclear de TcRPA31-EGFP.

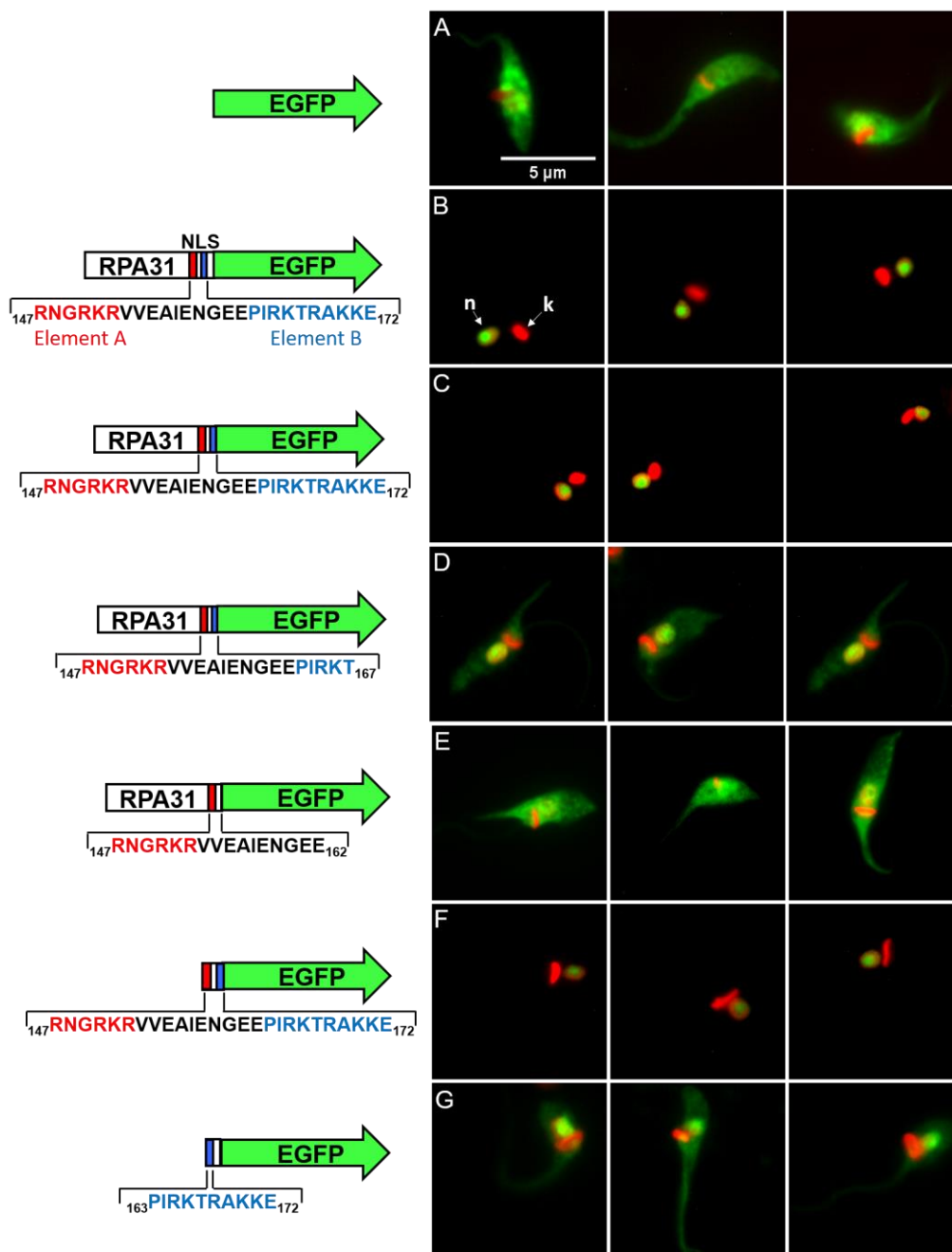


Figura 16 Localización celular de versiones escindidas de TcRPA31-EGFP. Imágenes representativas que muestran el patrón de fluorescencia de la proteína de fusión TcRPA31-EGFP y varias versiones escindidas, en rojo se observa la fluorescencia con DAPI. Los epimastigotes se transfectaron con las construcciones que se representan a la izquierda. Los elementos A y B que conforman la señal de localización nuclear de TcRPA31 se presentan en rojo y azul respectivamente. Todas las fusiones comienzan con una metionina inicial que mantiene en fase el marco de lectura. Los 26 aminoácidos que conforman la NLS son suficientes para la localización nuclear de TcRPA31 (Línea F).

6.4 Inhibición de la importación nuclear de TcRPA31 con ivermectina

La ivermectina es una droga con actividad inhibitoria específica de la vía clásica de importación nuclear (Wagstaff *et al.*, 2012). En cultivos de epimastigotes transfectados con RPA31-EGFP evaluamos el efecto de ivermectina a una concentración reportada y efectiva de 25 μM a diferentes tiempos y logramos ver su efecto desde las 2 horas (Figura 17).

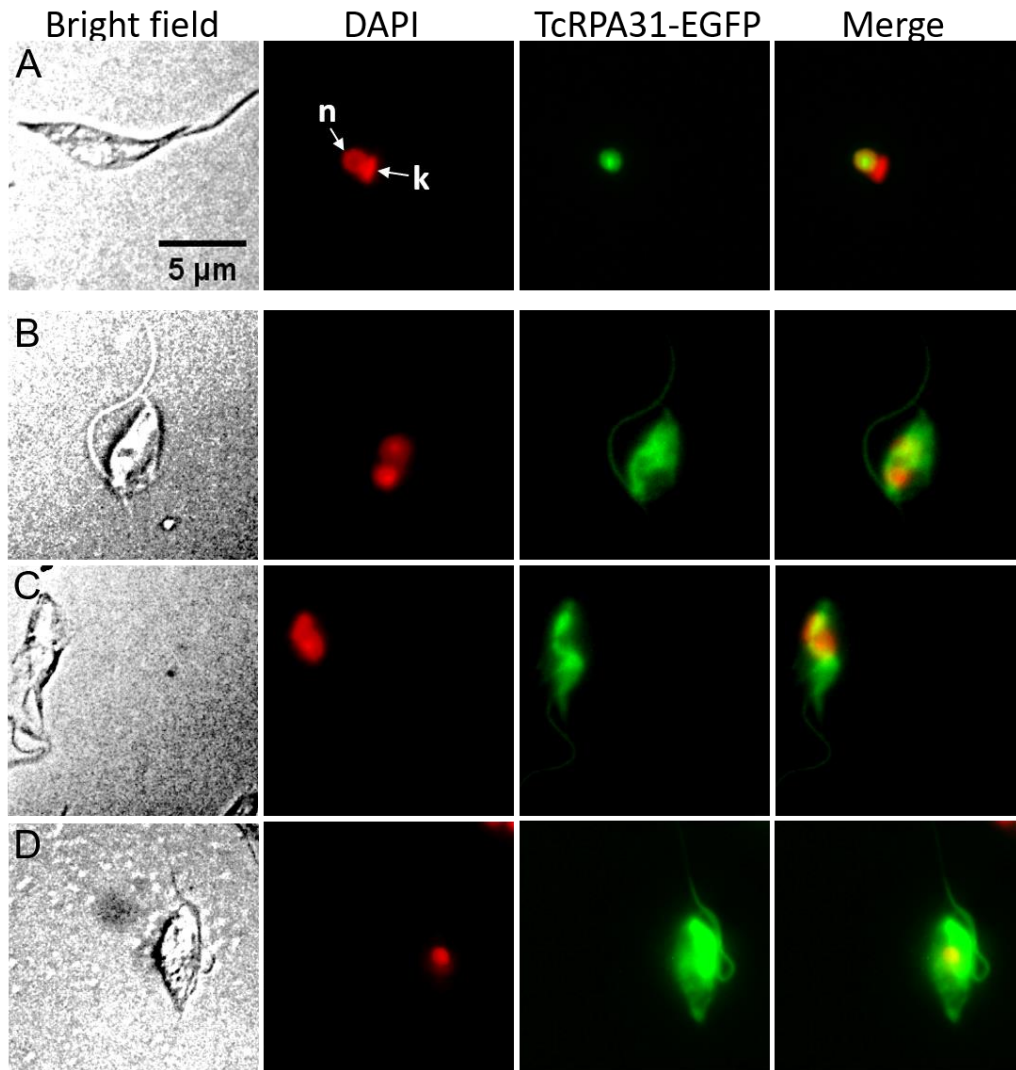


Figura 17 Inhibición de la importación nuclear de TcRPA31-EGFP con ivermectina.

Se observan epimastigotes transfectados con TcRPA31-EGFP que se incubaron con ivermectina [25 μM] (B-D) mientras que el control (A) se trató con etanol al 0.1%, que se utilizó como vehículo, por dos horas a 28 °C. Se presentan imágenes representativas de parásitos que se trataron con ivermectina y se observaron por microscopía de fluorescencia. El núcleo se indica con (n) y el cinetoplasto con (k).

6.5 Conservación de estructura y dominios ARM de TcImportina- α

En la vía clásica de importación nuclear, la importina α es el primer contacto de interacción entre la proteína cargo y el sistema de transporte nuclear. Por ello se estudió informáticamente esta proteína como se indica a continuación. Para saber si la secuencia proteica de importina- α de tripanosomas (*T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*) está conservada, se compararon las secuencias de importina α de tripanosomátidos con las secuencias ortólogas de *S. cerevisiae* y *H. sapiens* mediante un alineamiento con el programa CLUSTAL OMEGA. Se hizo una predicción de dominios que conforman a los ortólogos de importina α con los programas InterPro y Pfam. Posteriormente se realizó una predicción de su estructura secundaria para ubicar a las hélices alfa que conforman a cada uno de los dominios armadillo (ARM) usando el programa PHYRE2. Se pudo observar que la posición de los dominios ARM está muy conservada. Además, se obtuvo que cada dominio está conformado por 3 hélices alfa, que de igual manera conservan su posición y longitud dentro de cada dominio. Resulta interesante que la mayoría de los dominios ARM aparecen separados por una glicina conservada, que no ha sido reportada. En el caso de tripanosomátidos el dominio de unión a importina α (IBB) no fue detectado por los programas Pfam e InterPro (Figura 18A). Se generaron modelos estructurales de las proteínas ortólogas de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major* y *S. cerevisiae* con los programas SWISS-MODEL e I-TASSER. De ellos, se puede observar una estructura de alfa solenoide generada por el arreglo hélice-giro-hélice de importina α de tripanosomátidos. De manera similar a *S. cerevisiae*, la estructura de importina α de tripanosomátidos conserva un arreglo de 3 hélices alfa por cada dominio ARM. Se hace notar que la glicina conservada se ubica estructuralmente entre dos dominios ARM (Figura 18B)

Figura 18 Alineamiento entre ortólogos de importina α y su predicción estructural. A) Alineamiento entre secuencias proteicas ortólogas de importina α de *L. major* (LmjF.30.1120), *T. brucei* (Tb927.6.2640), *T. cruzi* (509965.110), *S.cerevisiae* (NP_014210.1) e importina α -6 de *H. sapiens* (NP_001353233.1) realizado con CLUSTAL OMEGA. La predicción de los dominios pertenecientes a cada una de las secuencias ortólogas se realizó de manera individual con los programas informáticos Pfam e InterPro, la predicción de hélices alfa se realizó con el programa PHYRE 2. Los dominios ARM predichos se encuentran en casillas negras, mientras que con letras rojas se resaltan las hélices alfa que conforman a cada uno de los dominios ARM. En el caso de *T. cruzi* el dominio ARM 8 no se detectó con ningún programa, sin embargo, esta región conserva 3 hélices alfa de un potencial dominio ARM. En azul se indica una glicina espaciadora conservada en las 5 secuencias analizadas entre cada dominio ARM. Finalmente se subraya el dominio IBB de *H. sapiens* y *S. cerevisiae*, resaltando en color gris los tres grupos de residuos básicos que participan en el proceso de auto-inhibición de importina α . En el caso de tripanosomátidos el dominio IBB no se identificó con ningún programa y solo se resaltan en negritas los residuos básicos que se encuentran el extremo amino de manera salteada. B) La predicción estructural se realizó con el programa SWISS-MODEL. Como plantilla se usó la estructura cristalizada de importina α de *S. cerevisiae* (1wa5.1). Los archivos PDB obtenidos se trabajaron de manera individual con el programa PyMOL. En las 4 estructuras los dominios ARM se resaltan en azul, mientras que el dominio IBB de importina α de *S. cerevisiae* se resalta en naranja. Finalmente se hace un aumento del dominio ARM1 unido a una de las glicinas conservadas en *S. cerevisiae*.

6.6 Abundancia y localización subcelular de TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis en el crecimiento y la diferenciación a metacicloogénesis

En nuestro grupo de investigación hemos establecido el sistema de crecimiento y metacicloogénesis de epimastigotes *in vitro* para tratar de reproducir esta transición que experimenta el parásito en el insecto vector. Se ha reportado que epimastigotes en fase estacionaria pueden dar lugar a formas no replicativas de tripomastigotes metacíclicos que es la siguiente etapa de desarrollo en el ciclo de vida de *T. cruzi* (Camargo, 1964; Hernández *et. al.*, 2012). Se evaluó si la expresión y localización subcelular de TcImportina α varía en condiciones de crecimiento y diferenciación. Para realizar esto se generaron las proteínas de fusión TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis y se evaluó su expresión en lisados de parásitos transfectados con ambas construcciones de manera individual (Figura 19). Posteriormente se evaluó la abundancia en crecimiento de los epimastigotes, sin ninguna diferencia aparente en las etapas de crecimiento exponencial y estacionario (Figura 20). Una vez observada la expresión de las proteínas TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis se procedió a evaluar su localización subcelular en crecimiento exponencial y estacionario. La señal de fluorescencia en crecimiento exponencial se localiza en el núcleo con un arreglo característico del nucléolo (Figuras 21A-D y 22A-D). En epimastigotes en crecimiento estacionario y en tripomastigotes metacíclicos la señal de fluorescencia se localiza en el nucleoplasma con un arreglo de puntos mas intensos distribuidos aleatoriamente en el núcleo (Figuras 21E-L y 22E-L).

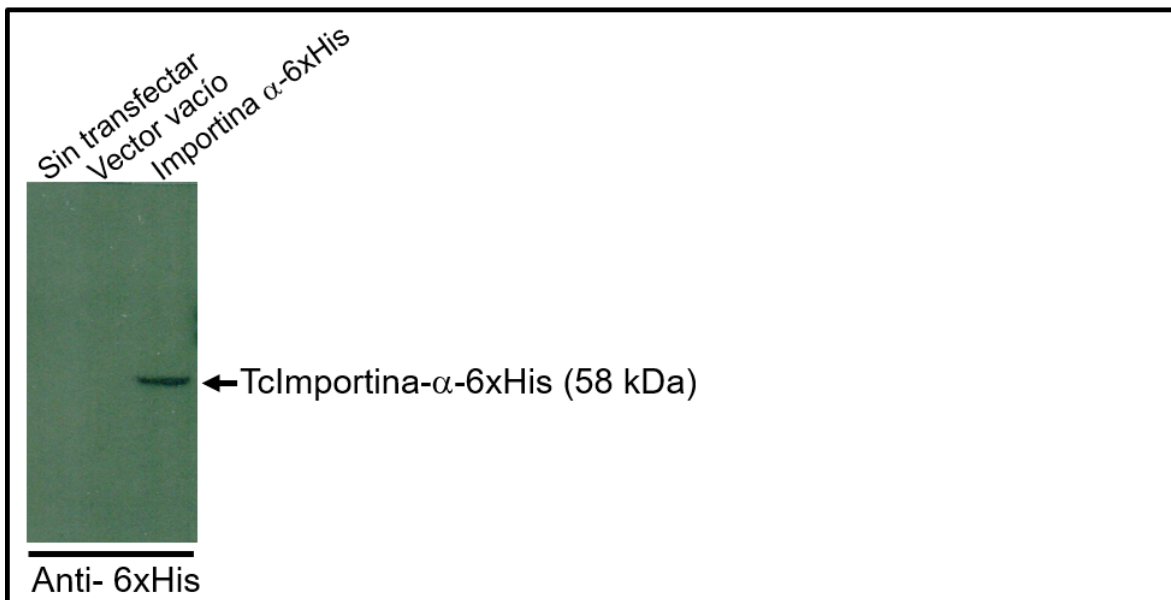
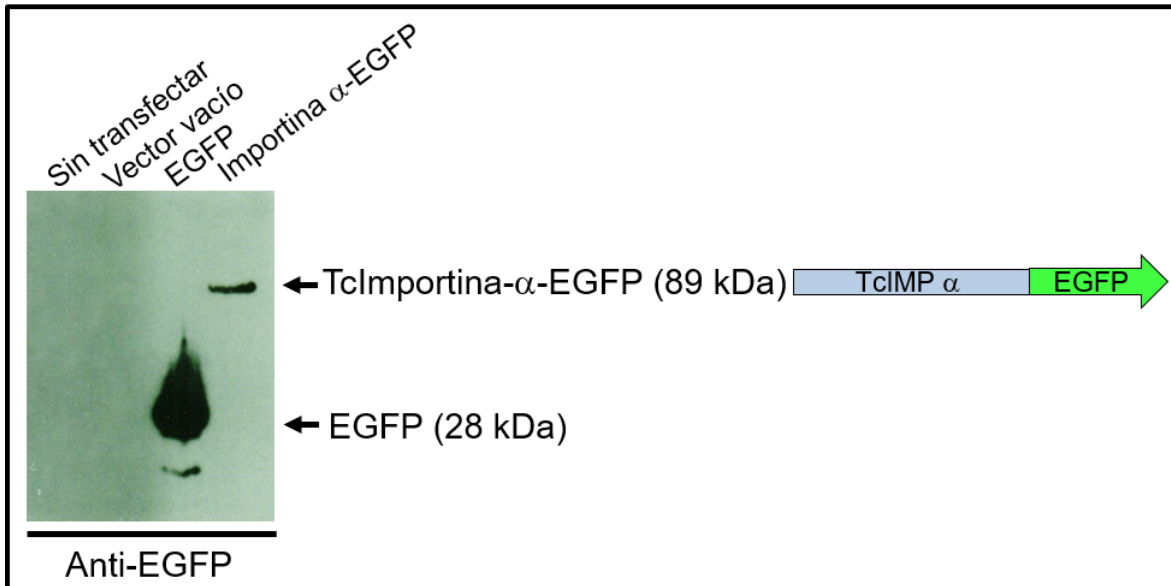


Figura 19 Expresión de TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis. A) Western blot de lisado de epimastigotes transfectados con EGFP (28kDa) y TcImportina- α -EGFP (89 kDa), se detectan bandas específicas en los sitios de migración esperados, mientras que en los controles sin transfectar o transfectados con el vector vacío no se observa señal. B) Western blot de lisado de epimastigotes transfectados con TcImportina- α -6xHis (58 kDa), se detecta una banda específica en el sitio de migración esperado, mientras que en los controles no se observa dicha banda.

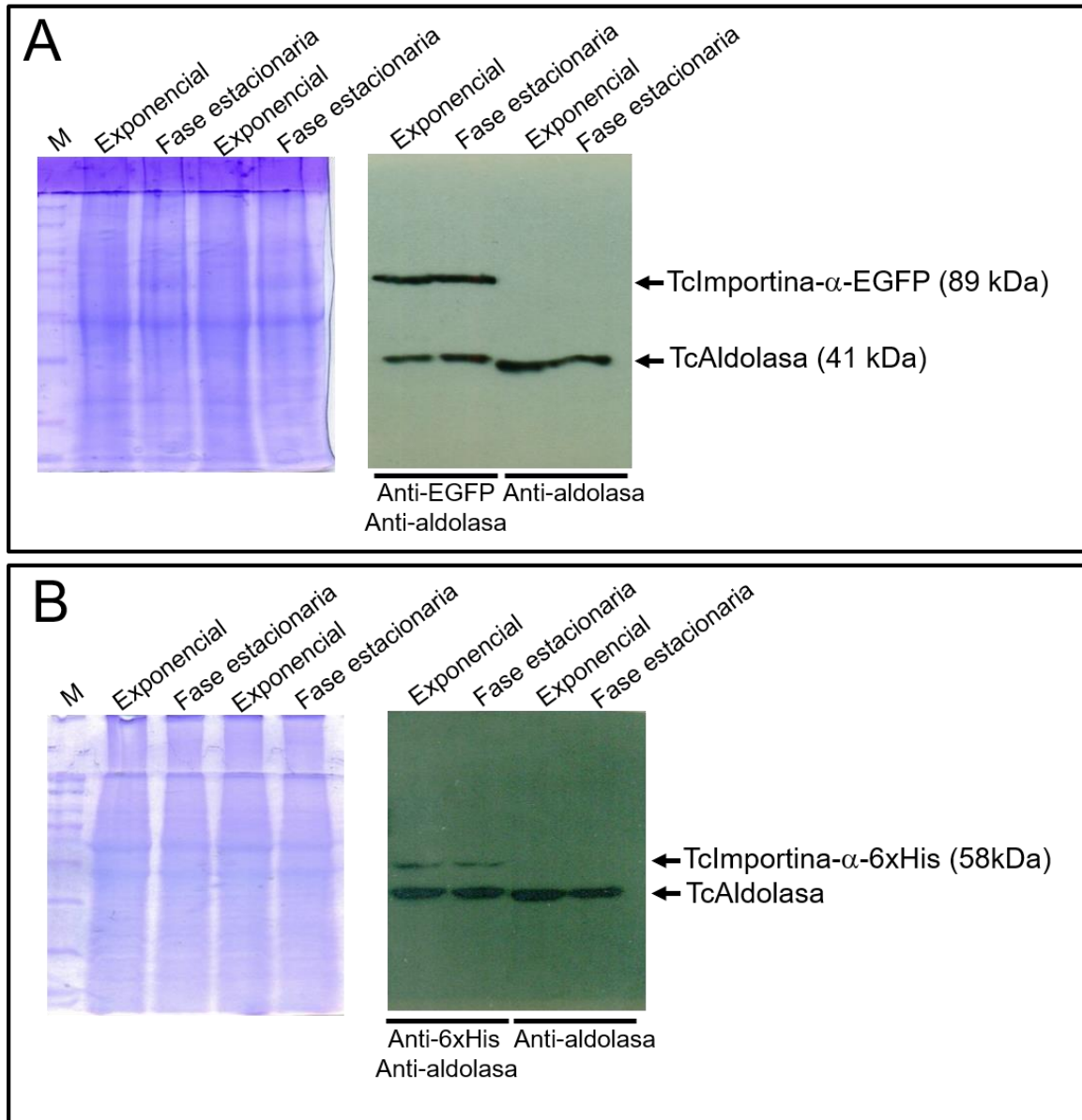


Figura 20 Expresión de TcImportina- α -EGFP y TcImportina- α -6xHis en epimastigotes en crecimiento exponencial y estacionario. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se tiñeron con azul de Coomassie como control de carga (Izquierda). A) Western blot de lisado de epimastigotes transfectados con TcImportina- α -EGFP y evaluados con un anticuerpo contra EGFP. B) Western blot de lisado de epimastigotes transfectados con TcImportina- α -6xHis y evaluados con un anticuerpo anti 6xHis. Como control de carga se observa la TcAldolasa (41kDa) que se incubó de manera simultanea con los anticuerpos primarios anti-EGFP y anti-6xHis en cada ensayo.

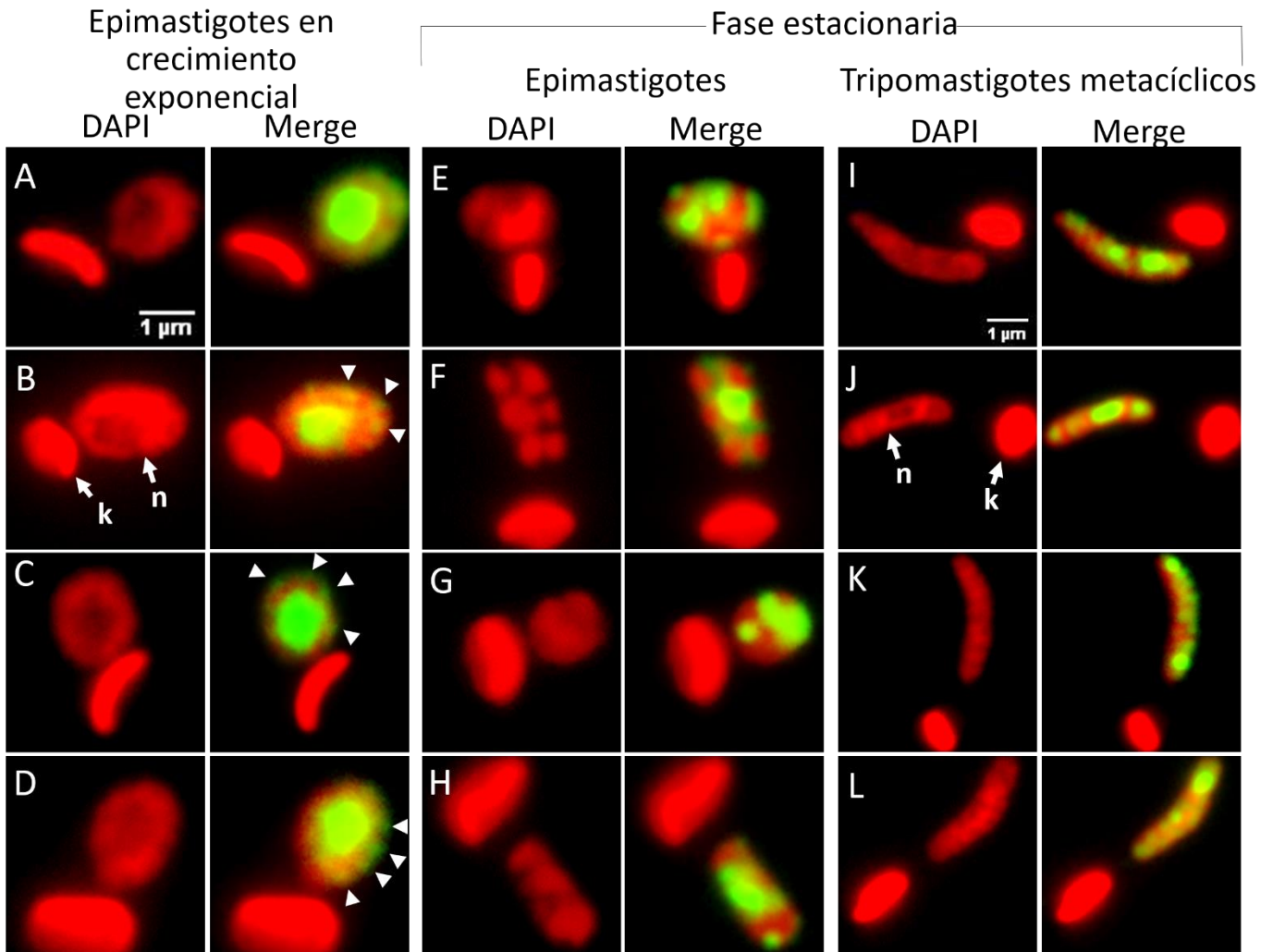


Figura 21 Localización subcelular de TcImportina- α -EGFP en el crecimiento y la diferenciación de epimastigotes *in vitro*. A-D) La localización subcelular de TcImportina- α -EGFP en epimastigotes en crecimiento exponencial se enriquece en el nucléolo de manera bien definida con un arreglo de puntos en la periferia nuclear (indicados con puntas de flecha). E-H) En fase estacionaria la señal de fluorescencia parece distribuirse en subdominios a lo largo del nucleoplasma. I-L) En tripomastigotes metacíclicos se observan dos puntos con mayor intensidad y otras regiones más tenues a lo largo de nucleoplasma. El núcleo de tripomastigotes es alargado. Se indica el cinetoplasto (k) y el núcleo (n).

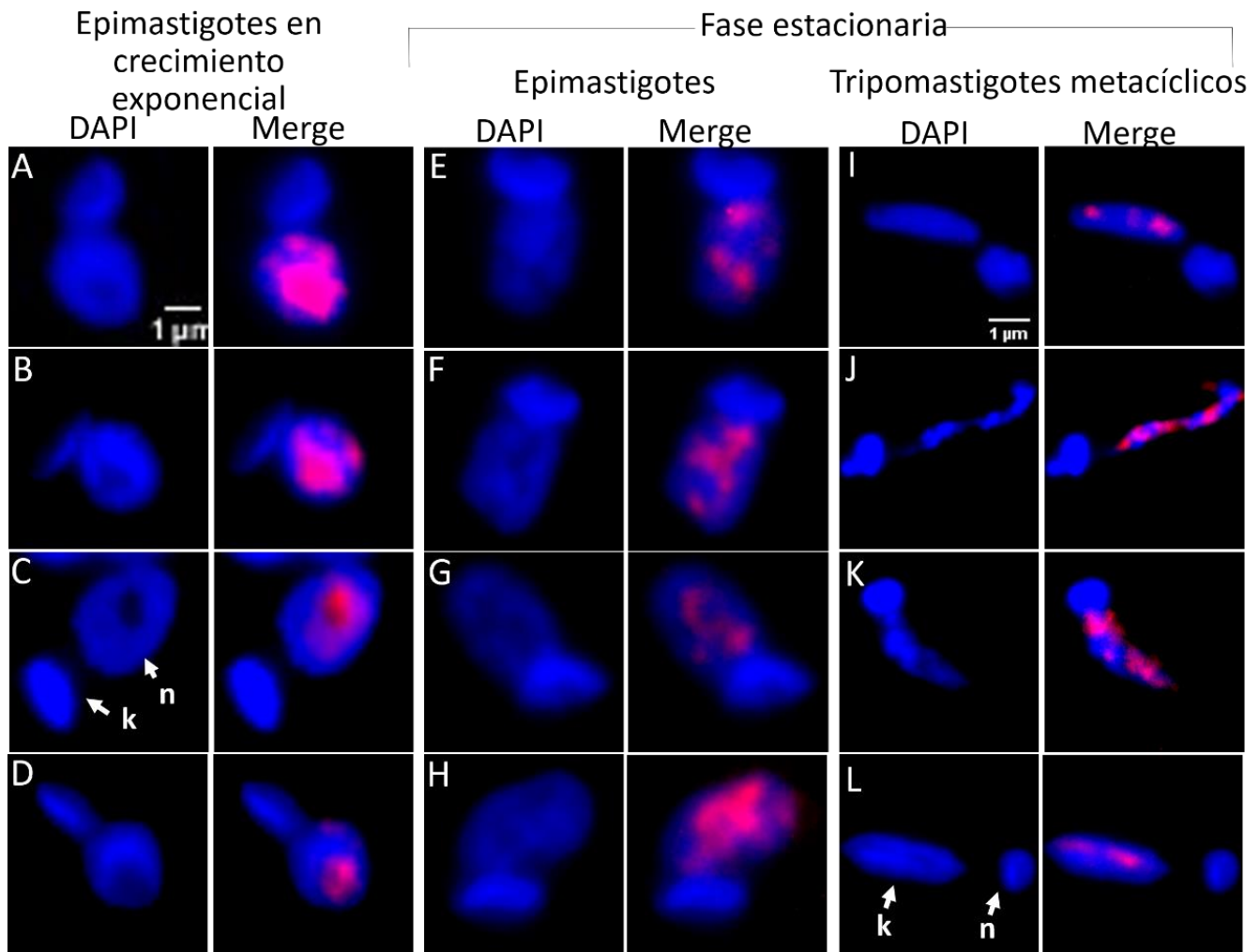


Figura 22 Inmunolocalización de TcImportina- α -6xHis en el crecimiento y la diferenciación de epimastigotes *in vitro*. A-D) La localización subcelular de TcImportina- α -6xHis en epimastigotes en crecimiento exponencial se enriquece en el nucléolo de manera bien definida. E-H) En crecimiento estacionario la señal de fluorescencia parece distribuirse en subdominios a lo largo del nucleoplasma. I-L) En tripomastigotes metacíclicos se observa distribuido a lo largo de nucleoplasma. El núcleo de tripomastigotes es alargado. Se indica el cinetoplasto (k) y el núcleo (n).

6.7 Deleción del extremo amino de TcImportina- α

El extremo amino de importina α de mamíferos y *S. cerevisiae* contiene el elemento de unión para importina β (IBB Domain) (Lott y Cingolani, 2011). Esto hace que el transporte de importina α al nucleoplasma sea dependiente de importina β , al menos en eucariontes multicelulares. Como hipótesis, se planteó que al eliminar el extremo amino de TcImportina- α se podría impedir su posible unión a importina β y por lo tanto su transporte nuclear. Se procedió a generar dos versiones escindidas de TcImportina- α . En una construcción se eliminó el extremo amino de TcImportina- α fusionada a EGFP y en la otra construcción se fusionó el extremo amino a EGFP en su extremo carboxilo, obteniendo así las construcciones Δ IBB-EGFP e IBB-EGFP. La localización subcelular de Δ IBB-EGFP e IBB-EGFP siguió siendo nuclear, similar a lo que se observó con la versión completa de la proteína (Figura 23).

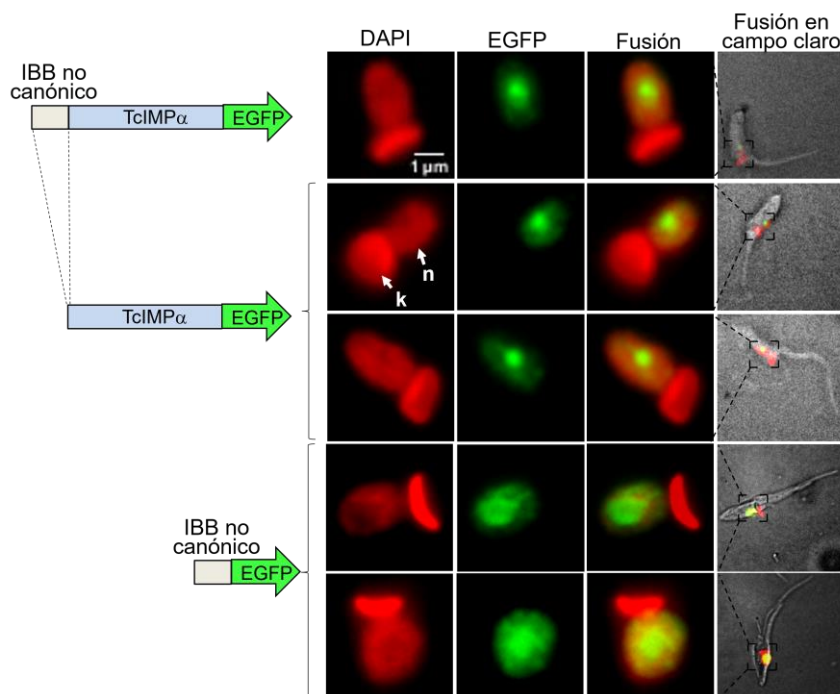


Figura 23 Localización subcelular de Δ IBB-EGFP e IBB-EGFP. La localización subcelular de Δ IBB-EGFP e IBB-EGFP es nuclear, con un enriquecimiento en el nucléolo similar a lo que ocurre con la proteína completa TcImportina- α -EGFP. Se indica el cinetoplasto (k) y el núcleo (n).

6.8 Co-localización e interacción entre TcImportina- α -6xHis y TcRPA31-EGFP

Los ensayos de la deslocalización nuclear de TcRPA31-EGFP en parásitos tratados con la droga ivermectina sugirieron que TcRPA31 podría ser transportada al núcleo por la vía clásica de importación de proteínas α/β . Para averiguar si TcRPA31 es transportada al núcleo por la vía clásica se procedió a evaluar su posible interacción con TcImportina α en primera instancia. Para esto se cotransfectaron epimastigotes de *T. cruzi* con las construcciones plasmídicas que codifican a las proteínas recombinantes TcImportina- α -6xHis y TcRPA31-EGFP. Los parásitos cotransfectados coexpresaron ambas proteínas recombinantes cuya ubicación celular colocalizó en el nucléolo (Figura 24A-B). Se procedió a evaluar una posible interacción entre ambas proteínas con lisado de parásitos cotransfectados. Se observó que TcRPA31-EGFP solamente se encuentra en presencia de TcImportina- α -6xHis, el control con TcRPA31-EGFP no genera ninguna interacción inespecífica con la matriz de agarosa Ni-NTA (Figura 24C).

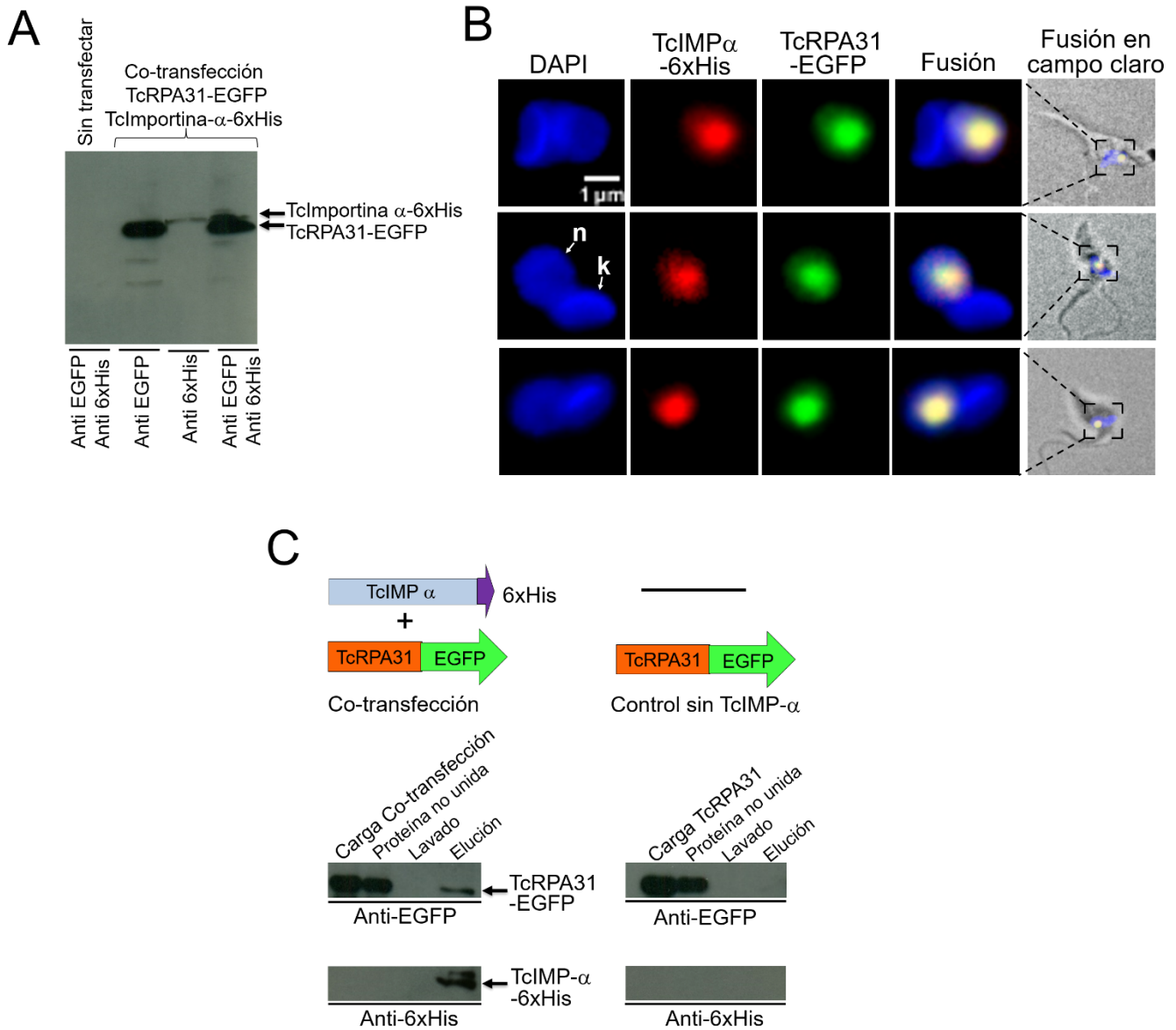


Figura 24 Co-localización e interacción entre TcImportina- α -6xHis y TcRPA31-EGFP. A) Western blot de lisado de epimastigotes co-transfectados con TcImportina- α -6xHis y TcRPA31-EGFP, se detectan bandas específicas en los sitios de migración esperados, mientras que en el control sin transfectar no se observa señal. B) Colocalización entre TcImportina- α -6xHis y TcRPA31-EGFP de los mismos parásitos cotransfectados. Se indica el núcleo (n) y el cinetoplasto (k). C) Ensayo de interacción en el que se observa la presencia de TcRPA31-EGFP en presencia de TcImportina- α -6xHis, en el caso del control sin TcImportina- α -6xHis no es así.

6.9 Interacción entre la señal de localización nuclear de TcRPA31 y TcImportina- α -6xHis

Con la intención de averiguar si la interacción entre TcRPA31-EGFP y TcImportina- α -6xHis era replicable con lisados de bacterias, se procedió a hacer los ensayos de interacción. Se observó que la banda correspondiente a la proteína TcRPA31-EGFP se presenta solamente en presencia de TcImportina- α -6xHis de manera similar a lo que se había observado con los lisados de parásitos cotransfectados con ambas construcciones (Figura 25A). Posteriormente se evaluó si esta interacción era mediada por la señal de localización nuclear de TcRPA31 ($_{147}\text{RNGRKR VVEAIENGEEPIRKTRAKKE}_{172}$). Para esto se generó una fusión entre esta NLS y EGFP en su extremo carboxilo obteniendo la construcción NLS-EGFP. La proteína NLS-EGFP es capaz de interactuar con Tcimportina- α -6xHis (Figura 25B). Se planteó la interrogante de si el elemento esencial de importación nuclear de esta NLS (Elemento B) participa en la interacción con TcImportina- α . Para esto se generaron versiones escindidas de la NLS de TcRPA31 fusionadas a EGFP en su extremo carboxilo y se procedió a hacer los ensayos de interacción con TcImportina- α -6xHis. Los resultados indican que cuando la NLS carece de los últimos 5 residuos ($_{168}\text{RAKKE}_{172}$) (Figura 25C), la interacción se sigue llevando a cabo, sin embargo, al carecer de los últimos 10 residuos que conforman el elemento B ($_{163}\text{PIRKTRAKKE}_{172}$) (Figura 25D) la interacción con TcImportina- α -6xHis no se presenta, tal y como sucede con el control EGFP (Figura 25E). Estos datos sugieren que el elemento B de la NLS de TcRPA31 es indispensable para la interacción con TcImportina- α -6xHis.

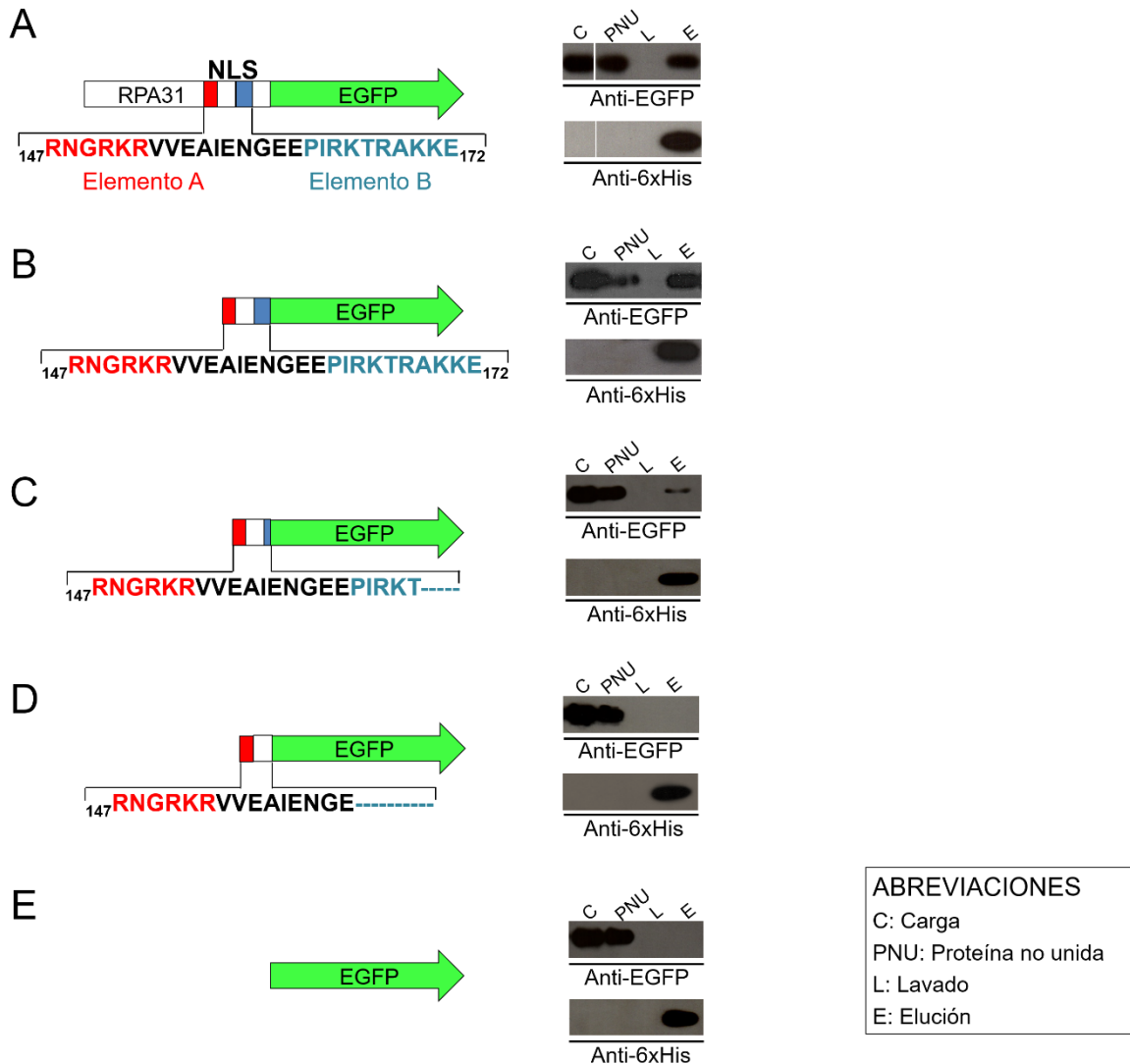


Figura 25 Interacción entre versiones escindidas de TcRPA31-EGFP y TcImportina- α -6xHis. A-C) TcImportina- α -6xHis interacciona con la proteína TcRPA31-EGFP, su NLS y la NLS sin los últimos 5 residuos. D) Se observa que la interacción deja de presentarse cuando los últimos 10 aminoácidos que conforman el elemento B de la NLS de TcRPA31 son eliminados. E) El control con EGFP no genera ninguna interacción inespecífica con la matriz de Ni-NTA.

6.10 Efecto de ivermectina en la interacción NLS de TcRPA31 y TcImportina- α

En los resultados iniciales del proyecto se había observado que la droga ivermectina genera un efecto de deslocalización nuclear de TcRPA31-EGFP, sugiriendo que la importación de TcRPA31 se lleva a cabo por la vía clásica de importación de proteínas (importina- α /importina β). Se planteó que la interacción NLS-EGFP y TcImportina- α -6xHis pudiera ser sensible a ivermectina, por lo que se probó la concentración de ivermectina a [250 μ M]. Se pudo observar que la interacción se ve afectada al mostrar una disminución de intensidad en la banda correspondiente a la elución de la NLS-EGFP en presencia de ivermectina al compararlo con el control sin la droga. Se pudo apreciar que los niveles de TcImportina- α son similares (Figura 26).

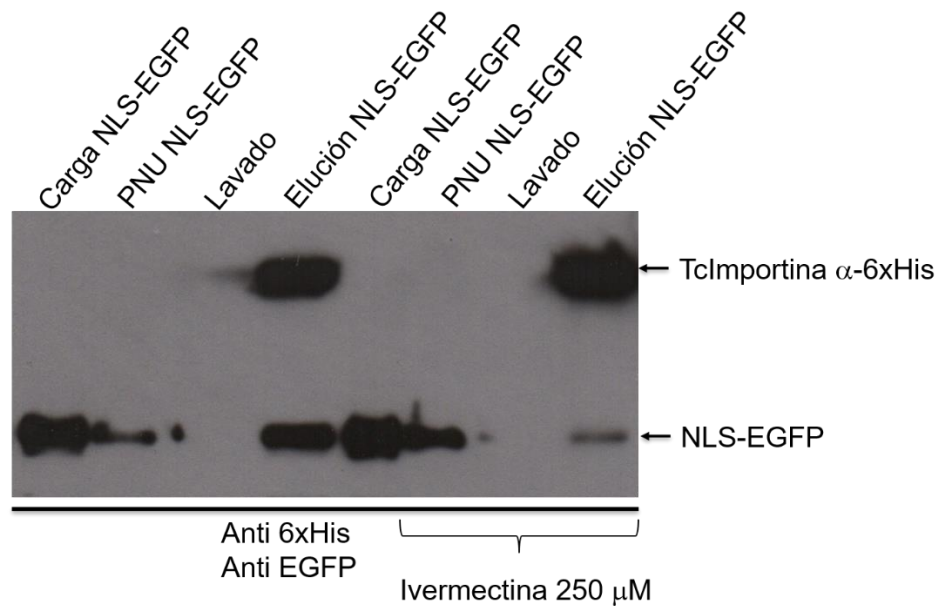


Figura 26 Efecto de ivermectina [250 μ M] en la interacción NLS-EGFP y TcImportina- α -6xHis *in vitro*. Se observa que en presencia de ivermectina la señal de la proteína NLS-EGFP disminuye al compararlo con el control sin ivermectina.

6.11 Predicción de señales de localización nuclear clásicas (cNLSs) en el proteoma nuclear de *T. brucei* y de *T. cruzi*

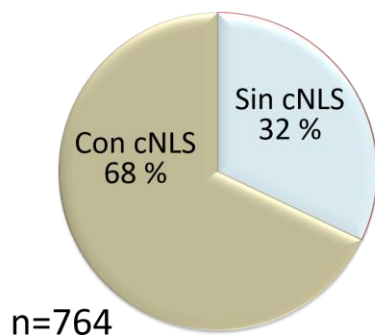
Con base en la disponibilidad de los proteomas nucleares de *T. brucei* y de *T. cruzi* publicados recientemente (Goos *et al.*, 2017; dos Santos Júnior *et al.*, 2015), y la disponibilidad de programas informáticos que identifican señales de localización nuclear clásicas (cNLSs), se analizaron ambas bases de datos para predecir cNLSs potenciales. Se reportó que el proteoma nuclear de *T. brucei* está conformado por 764 proteínas y el de *T. cruzi* por 864 proteínas. Inicialmente se obtuvieron los números de acceso correspondientes a cada una de las proteínas reportadas en dichos proteomas y se buscó su secuencia proteica en la base de datos TriTrypDB. Cada una de las secuencias proteicas se analizó individualmente con el programa PSORT II para predecir una posible señal de localización nuclear clásica, que puede ser del tipo monopartita o bipartita (Nakai y Horton, 1999). En ambos proteomas nucleares se evaluó la secuencia de cada una de las proteínas para saber cuales cuentan con una cNLS. En el caso de *T. brucei* se encontró que el ~ 68% (519 proteínas) del proteoma nuclear es reconocido como portador de un motivo cNLS, mientras que el ~ 32% (245 proteínas) no lo presenta (Figura 27A). Con la intención de conocer la distribución del tipo de cNLS que presentan las proteínas se hicieron diagramas de Venn y se dividieron entre monopartitas, bipartitas y las que comparten ambos tipos de señales. El 62.6 % (325 proteínas) cuentan con al menos una NLS monopartita, el 12.1 % (63 proteínas) con al menos una señal bipartita, mientras que el 24.3 % (131 proteínas) tienen ambos tipos de señales (Figura 27B). Por otra parte, el proteoma nuclear de *T. cruzi* cuenta con un 40.7 % (352 proteínas) de proteínas con cNLS, mientras que el 59.3% (512 proteínas) no tienen (Figura 27C). Tomando en cuenta la distribución de proteínas con cNLS, el 58.8% (207 proteínas) tienen al menos una señal monopartita, el 21.3 % cuenta con al menos una señal bipartita y el 19.9 % (70 proteínas) restante tienen ambos tipos (Figura 27D).

Porcentaje de proteínas con cNLS

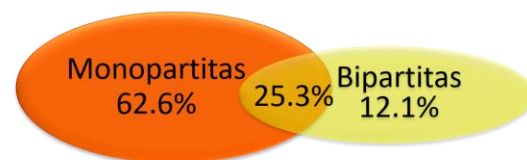
Tipo de cNLS

A

T. brucei

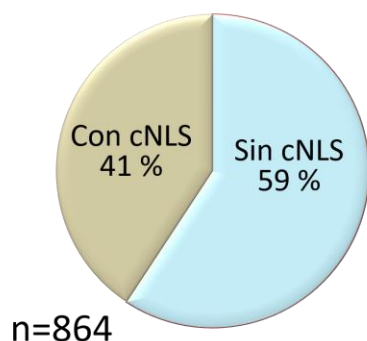


B



C

T. cruzi



D

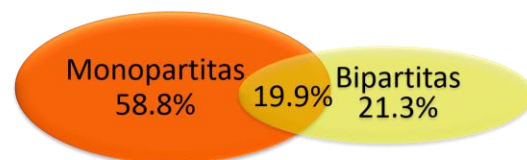


Figura 27 Predicción de cNLSs del proteoma nuclear de *T. brucei* y de *T. cruzi* con el programa PSORT II. A y C diagrama que representa el porcentaje de proteínas que tienen al menos una cNLS potencial del proteoma nuclear de *T. brucei* (764 proteínas totales) y de *T. cruzi* (864 proteínas totales). B y D diagramas de Venn que representan la distribución entre las proteínas con cNLS monopartitas, bipartitas y las que tienen de ambos tipos de señales. En *T. brucei* se analizaron 519 proteínas y para *T. cruzi* 352 proteínas.

6.12 Identificación de secuencias consenso para importación nuclear en tripanosomátidos

Para conocer si se presenta un posible patrón en la frecuencia de los aminoácidos que conforman las señales monopartitas y bipartitas, se eligieron de manera independiente las proteínas de ambos proteomas nucleares que contaran exclusivamente con un solo motivo monopartita o uno bipartita, descartando aquellas proteínas que presentaron más de un motivo cNLS. Se realizaron alineamientos de las cNLS en el programa Clustal Omega y posteriormente se analizaron las frecuencias de los aminoácidos con el programa Weblogo (Crooks *et al.*, 2004). En el caso de las cNLS monopartitas se obtuvieron mayoritariamente dos poblaciones conformadas por 4 o por 7 aminoácidos. De ellas se proponen los siguientes consensos: Para la monopartita de 4 residuos se proponen los consensos B_4 y $B(B_2P)$, en donde B es cualquier aminoácido básico y P es prolina. Para la monopartita de 7 residuos se propone el consenso $P[(R/K)_3X_3]$ en donde X es cualquier aminoácido. Por otra parte, las señales bipartitas mostraron una población mayoritaria conformada por 17 aminoácidos cuya secuencia consenso consiste en $(R/K)_2 X_{10} (B_3 X_2)$ (Figura 28).

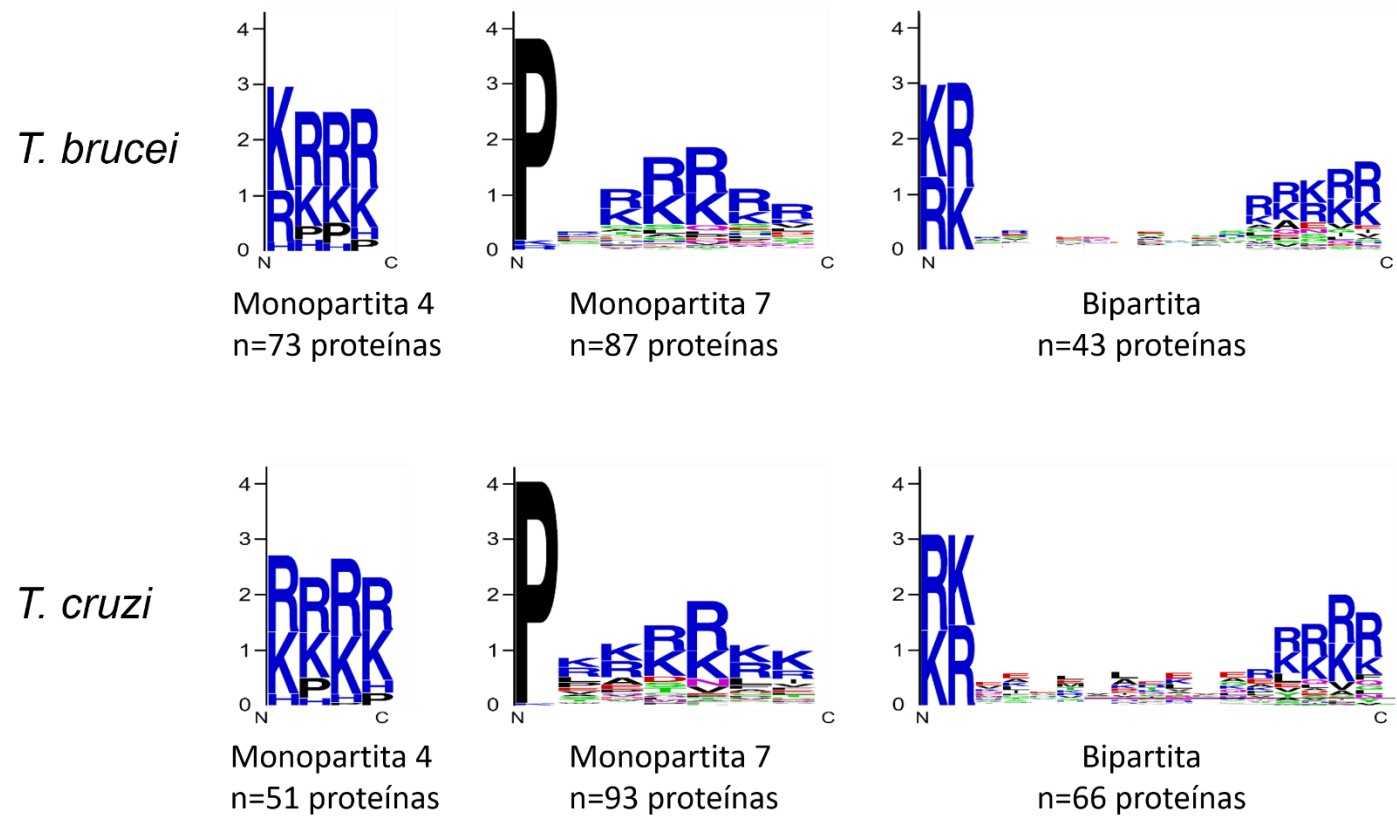


Figura 28 Weblogos que muestran la frecuencia relativa de aminoácidos que conforman las cNLSs de tripanosomátidos. Las monopartitas de 4 aa de *T. brucei* (73 proteínas) y la de *T. cruzi* (51 proteínas) (Izquierda) obteniendo las secuencias consenso B₄ y B(B₂P) en donde B= arginina, lisina o histidina. En la parte central se pueden observar los Weblogos que conforman las NLSs monopartita de 7 aa de *T. brucei* (87 proteínas) y de *T. cruzi* (93 proteínas) obteniendo la secuencia consenso global P[(R/K)₃X₃] en donde X= corresponde a cualquier aminoácido en cualquier orden. A la derecha se observan los weblogos que corresponden a las NLSs bipartitas de *T. brucei* (43 proteínas) y *T. cruzi* (66 proteínas), obteniendo la secuencia consenso (R/K)₂ X₁₀ (B₃ X₂).

7. DISCUSIÓN

Abundancia y localización celular de TcRPA31 en el crecimiento y en la diferenciación de los epimastigotes

La localización nuclear de TcRPA31 en fase exponencial, se concentra de manera intensa en un arreglo característico del nucléolo en una forma bien definida con una señal más ligera en el nucleoplasma, esto correlaciona con la localización nucleolar observada para otras subunidades de la RNA Pol I, que sintetiza el rRNA en el nucléolo en eucariontes. En epimastigotes de fase estacionaria y en tripomastigotes metacíclicos la distribución de TcRPA31 se observa en un nucléolo disgregado en subdominios en distintas regiones del nucleoplasma. Se puede hipotetizar que los cambios en la estructura nucleolar evidenciados por la reorganización de TcRPA31 pueden estar relacionados a una disminución en la transcripción de los genes de rRNA observada en la fase estacionaria del cultivo (Elias *et al.*, 2001; Nepomuceno-Mejía *et al.*, 2010).

Caracterización de la NLS de TcRPA31

La proteína TcRPA31 posee una señal de localización nuclear clásica y funcional de tipo bipartita, hacia su extremo carboxilo. Esta señal está conformada por dos regiones enriquecidas con aminoácidos básicos (R y K) y separados por una región espaciadora (Robbins *et al.*, 1991). Cuando se elimina el elemento A y la región espaciadora, se observa que la fluorescencia se distribuye entre el núcleo y el citoplasma, lo que nos indica que esta región participa parcialmente en su localización nuclear. Sin embargo, cuando se elimina el elemento B, se observa que la fluorescencia se distribuye de manera homogénea en todo el cuerpo del parásito. Lo anterior indica que este elemento es esencial para la localización nuclear de TcRPA31. Puede así concluirse que la NLS de TcRPA31 está conformada por la secuencia bipartita de 26 residuos ¹⁴⁷RNGRKRVEAIENGEEPIRKTRAKKE¹⁷².

Deslocalización nuclear de TcRPA31 con ivermectina

A pesar de que la vía clásica de importación nuclear de importinas α/β ha sido extensamente estudiada en diferentes modelos biológicos, como levaduras, mamíferos y plantas, en tripanosomátidos los estudios son escasos. Se observó que la droga ivermectina inhibe la importación nuclear de TcRPA31, sugiriendo que la importación nuclear de TcRPA31 es por

la vía clásica α/β . Se ha reportado la inhibición del transporte nuclear clásico de diferentes proteínas nucleares en cultivos de líneas celulares de *H. sapiens*, *Plasmodium falciparum*, y diferentes proteínas virales de VIH, DENV, PRRSV y VEEV (Wagstaff *et al.*, 2012; Lundberg *et al.*, 2013; Tay *et al.*, 2013; Panchal *et al.*, 2014; Lee y Lee, 2015; Jans *et al.*, 2019). Sin embargo, a la fecha, importina α no había sido estudiada en tripanosomátidos.

Composición y modelaje estructural de TcImportina α

Los modelos estructurales generados en este trabajo de los ortólogos de importina α de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* presentan estructuras similares que comparten entre un 53% y 62% de identidad. Sin embargo, esta similitud decrece a 37%-39% cuando los ortólogos de tripanosomátidos se comparan con la importina α de *S. cerevisiae* (Canela-Pérez *et al.*, 2019). Con base en los modelos estructurales de importina α de tripanosomátidos, estas proteínas están compuestas por 9 dominios ARM conformados por tres hélices alfa. Los alineamientos muestran una glicina conservada que separa a todos los dominios ARM. También es importante mencionar que ninguno de los programas informáticos utilizados predicen un dominio IBB. Sin embargo, este dominio es reconocido en los ortólogos de esta proteína en *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. A pesar de que no se identificó un dominio IBB, se pueden detectar aminoácidos básicos dispersos en su extremo amino. Estos residuos básicos son hipotéticamente relevantes ya que podrían participar en un mecanismo de autoinhibición en importina α de tripanosomátidos, tal y como sucede en otros eucariontes (Cingolani *et al.*, 1999). La ausencia de un dominio IBB reconocible ha sido reportado en otras especies de protozoarios como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* y *Spironucleous salmonicida* (Mayol *et al.*, 2020). Sin embargo, varias especies del género *Plasmodium* y *Toxoplasma gondii* presentan un dominio IBB detectable (Dey y Patankar, 2018; Bhatti y Sullivan Jr, 2005). Estos datos podrían indicar una divergencia evolutiva en la secuencia o adquisición del dominio IBB en eucariontes.

Localización celular de TcImportina α en el crecimiento y la diferenciación

Importina α de mamíferos ha sido reportada como una proteína ubicua y soluble en citoplasma y núcleo. Sin embargo, la localización subcelular de TcImportina- α con ambas etiquetas (EGFP y 6xHis) es observada en el núcleo y un arreglo que muy probablemente

representa el nucléolo, con una serie de puntos en la periferia nuclear en crecimiento exponencial. En cultivos de crecimiento estacionario (epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos) se aprecia un patrón de fluorescencia granular distribuido en el nucleoplasma. Este patrón es similar a lo que se observó con TcRPA31 y con otra proteína nucleolar llamada L1C6 (Gluezn *et al.*, 2007; Canela Pérez *et al.*, 2018). El hecho de que TcImportina- α -6xHis colocalice con TcRPA31-EGFP fortalece la observación de que una fracción de la importina α es nucleolar. Estos resultados correlacionan con la localización nucleolar de importina α de *T. brucei* que se encuentra reportada en la base de datos TrypTag.org (Dean *et al.*, 2017). Además, importina α de *T. cruzi* y *T. brucei* se identificó en los proteomas nucleares de ambas especies (dos Santos Júnior *et al.*, 2015; Goos *et al.*, 2017). En *S. cerevisiae*, importina α se localiza en el núcleo unida a los complejos de poro nuclear y su enriquecimiento es totalmente nuclear por experimentos de fraccionamiento celular (Yano *et al.*, 1992).

Delección del dominio IBB de TcImportina α

Se sabe que importina α entra al núcleo en la forma de un complejo molecular con importina β mediada por la interacción con el dominio IBB. Este dominio de importina α de tripanosomátidos no es detectable informáticamente, sugiriendo que podría ser un dominio no canónico o estar ausente. De manera no esperada, las construcciones Δ IBB-EGFP e IBB-EGFP se localizan en el núcleo con un enriquecimiento nucléolar, sugiriendo que el transporte nuclear de TcImportina α requiere la participación de un transportador nuclear que no solo reconoce su extremo amino, sino también a otra región de TcImportina- α .

Interacción entre TcRPA31 y TcImportina α

Los resultados obtenidos de los ensayos de interacción con lisados de *T. cruzi* y lisados bacterianos indican que TcImportina α interacciona con TcRPA31 mediante su NLS, en la que el elemento B juega un papel esencial. Además, el fármaco ivermectina genera una disminución en la interacción entre la NLS de TcRPA31 y TcImportina α , lo que fortalece la hipótesis de que TcRPA31 es transportada al núcleo de *T. cruzi* mediante la vía clásica de importación nuclear. En *S. cerevisiae* y *M. musculus* se ha determinado que la interacción importina α -NLS bipartita de *Xenopus laevis* se debe principalmente a la participación de aminoácidos básicos (R y K) que interaccionan con los bolsillos mayor y menor de la

importina- α (Conti *et al.*, 1998; Marfori *et al.*, 2011). Cabe mencionar que la unión directa entre algunas proteínas nucleares e importina α ha sido reportada en *Arabidopsis thaliana* sin la presencia de importina β (Smith *et al.*, 1997). Esto es similar a lo que vemos con TcRPA31 y TcImportina α , sugiriendo que en tripanosomátidos TcImportina α podría ser un receptor directo para el transporte nuclear. Estos resultados nos aproximan aún más al entendimiento del transporte nuclear de proteínas en tripanosomátidos, ya que en estos parásitos no se ha reportado la interacción de ninguna NLS con el adaptador importina- α .

Búsqueda de secuencias consenso de reconocimiento para importación nuclear en tripanosomátidos

Con respecto a los análisis *in silico* correspondientes a las señales de localización nuclear, el proteoma nuclear de *T. brucei* contiene un 68 % de proteínas que cuentan con NLS clásicas y un 32% sin señales clásicas reconocibles. La situación es distinta para *T. cruzi* que presenta un 40.7 % de proteínas con NLS y un 59.3 % que no la tienen, sugiriendo que el proceso de transporte nuclear en este parásito pudiera tener una mayor diversidad de señales de transporte nuclear que el de *T. brucei* o *S. cerevisiae* (Lange *et al.*, 2007; Huh *et al.*, 2003). Las proteínas nucleares que no tienen una cNLS aparente, podrían ser reconocidas para ser importadas al núcleo a través de una vía no canónica o unirse en el citoplasma a proteínas que tienen una NLS para ser cotransportadas como complejos, proceso conocido como “piggy back” (Kambach y Mattaj, 1994).

Al analizar la distribución del tipo de cNLS en *T. brucei* y *T. cruzi* resulta evidente que la fracción de proteínas que cuentan con NLS monopartita es mayoritaria al compararse con las que cuentan con NLS bipartita. Las NLS monopartitas en *T. brucei* corresponden al 62.6 % y en *T. cruzi* al 59.8 %, mientras que las bipartitas en *T. brucei* son el 12.1 % y en *T. cruzi* son el 21.3 %. Esta inclinación de presión selectiva favorecida hacia las NLS monopartitas ha sido reportado en *S. cerevisiae*, en donde el 25.8 % son bipartitas y el 30.9 % monopartitas (Lange *et al.*, 2007). Los análisis de proteínas con cNLS muestran una fracción de proteínas que cuentan con ambos tipos de señal en su secuencia. En el caso de *T. brucei* es del 25.3 % y en *T. cruzi* es del 19.9 %. La presencia de múltiples NLS en una sola secuencia ha sido reportado y puede servir como un mecanismo de regulación para la concentración nuclear de distintas proteínas (Hunter *et al.*, 2014; Fischer-Fantuzzi y Vesco, 1988).

Las secuencias consenso para tripanosomátidos son de cuatro residuos (B_4) con 4 aminoácidos básicos o bien B (B_2P) conformada por un aminoácido básico seguido por tres aminoácidos que comprenden dos residuos básicos y una prolina en cualquier posición. Secuencias consenso similares para otros organismos han sido propuestas: $K(R/K)X(R/K)$ (Chelsky *et al.*, 1989), $K(K/R)X(K/R)$ (Hodel *et al.*, 2001), $KR(R/X)K$ (Fontes *et al.*, 2003), $KRRR$ (Kosugi *et al.*, 2008), $KR(K/R)R$ or $K(K/R)RK$ (Kosugi *et al.*, 2009a), $(R/K)_4$ y $(R/K)_3(H/P)$ de PSORT II. Para la secuencia de tripanosomátidos de siete residuos se obtuvo el consenso $P[(R/K)3X3]$, conformada por una prolina inicial seguida por seis residuos que comprenden 3 residuos básicos en cualquier posición. También han sido propuestas otras señales bipartitas consenso para eucariontes: $(K/R)(K/R)X_{10-12}(K/R)_{3/5}$ (Robbins *et al.*, 1991), $KRX_{10-12}KRRK$ (Fontes *et al.*, 2003), $KRX_{10-12}K(K/R)(K/R)$ y $KRX_{10-12}K(K/R)X(K/R)$ (Kosugi *et al.*, 2009a). La secuencia consenso para las señales bipartitas de tripanosomátidos es idéntico al de levadura $(R/K)_2 X_{10} (B_3 X_2)$. Considerando que los tripanosomátidos son organismos de divergencia evolutiva temprana, el hecho de que las cNLS se encuentren conservadas en tripanosomátidos y sean similares a las de levadura y metazoarios, en adición con la estructura conservada del andamiaje de los complejos de poro nuclear en distintos taxa incluyendo el género *Trypanosoma*, propuesta anteriormente (Obado *et al.*, 2016; Obado *et al.*, 2017), sugiere que la vía de importación nuclear clásica de organismos eucariontes es de origen evolutivo temprano y quizá ya estaba presente en el organismo hipotético “primer ancestro eucariota común” (FECA por sus siglas en inglés).

8. CONCLUSIONES

- Las proteínas TcRPA31 y TcImportina α son proteínas que pueden usarse como marcadores nucleolares en tripanosomátidos.
- La importación nuclear de TcRPA31 dependiente de una NLS bipartita, su deslocalización nuclear mediada por ivermectina y su interacción con TcImportina α , sugiere que la proteína adaptadora TcImportina α participa en el proceso de translocación nuclear de TcRPA31.
- Los cambios en la distribución nuclear de TcRPA31 y TcImportina- α indican que el nucléolo es un compartimento subnuclear dinámico dependiente del crecimiento y diferenciación a metacicloogénesis en *T. cruzi*.
- El análisis bioinformático de los proteomas nucleares de tripanosomátidos sugiere que las señales de localización nuclear clásicas surgieron en una etapa temprana de la evolución de las células nucleadas, ya que la similitud con las secuencias de levaduras, plantas y mamíferos es muy alta; posiblemente la vía clásica de transporte nuclear estuvo presente en el primer ancestro común de los eucariontes.
- El alto porcentaje de proteínas sin cNLS y proteínas con múltiples cNLS en *T. cruzi* y *T. brucei* sugiere que en estos parásitos el proceso de transporte nuclear es altamente complejo.

9. REFERENCIAS

1. Acosta H, Burchmore R, Naula C, Gualdrón-López M, Quintero-Troconis E, Cáceres AJ, Michels PAM, Concepción JL, Quiñones W. (2019). Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 229:62-74. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2019.02.008.
2. Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karni-Schmidt O, Williams R, Chait BT, Sali A, Rout MP. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature.* 450:695-701. DOI:10.1038/nature06405.
3. Albert B, Perez-Fernandez J, Léger-Silvestre I, Olivier Gadad O.(2012). Regulation of Ribosomal RNA Production by RNA Polymerase I: Does Elongation Come First?. *Genet Res Int.* 2012: 276948. DOI:10.1155/2012/276948.
4. Banerjee B, Roy A, Sen N, Majumder HK. (2010). A tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 from kinetoplastid parasite *Leishmania donovani* (LdTdp1) capable of removing topo I-DNA covalent complexes. *Mol Microbiol.*78(1):119-37. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07318.x.
5. Beck M, Hurt E. (2017). The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(2):73-89. DOI:10.1038/nrm.2016.147.
6. Bern C, Montgomery SP. (2009). An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 49(5):e52-4. DOI:10.1086/605091.
7. Bernardes NE, Takeda AA, Dreyer TR, Freitas FZ, Bertolini MC, Fontes MR. (2015). Structure of Importin- α from a Filamentous Fungus in Complex with a Classical Nuclear Localization Signal. *PLoS One.*10(6):e0128687. DOI:10.1371/journal.pone.0128687.
8. Bertani G., Weigle JJ. (1953). Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol.* 65(2): 113-121.
9. Bhatti MM, Sullivan WJ Jr. (2005). Histone acetylase GCN5 enters the nucleus via importin alpha in protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 280(7):5902-8. DOI:10.1074/jbc.M410656200.
10. Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A, Ponstingl H. (1994), RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(7):2587-91. DOI:10.1073/pnas.91.7.2587.
11. Bischoff FR, Ponstingl H. (1991), Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature.* 354(6348):80-2. DOI:10.1038/354080a0.
12. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 574– 585.
13. Bordonné R. (2000). Functional characterization of nuclear localization signals in yeast Sm proteins. *Mol Cell Biol.* 20(21):7943-54. DOI:10.1128/mcb.20.21.7943-7954.2000.
14. Boulikas T. (1993). Nuclear localization signals (NLS). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*3(3):193-227.
15. Brandenburg J, Schimanski B, Nogoceke E, Nguyen TN, Padovan JC, Chait BT, Cross GA, Günzl A. (2007). Multifunctional class I transcription in *Trypanosoma brucei* depends on a novel protein complex. *EMBO J.* 26(23):4856-66. DOI:10.1038/sj.emboj.7601905.

16. Cámara Mde L, Bouvier LA, Canepa GE, Miranda MR, Pereira CA. (2013). Molecular and Functional Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Nuclear Adenylate Kinase Isoform. *PLoS Negl Trop Dis*.7(2):e2044. DOI:10.1371/journal.pntd.0002044.
17. Camargo E. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 6:93-100.
18. Campbell DA, Sturm NR, Yu MC. (2000). Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitol Today*. 16(2):78-82. DOI:10.1016/s0169-4758(99)01545-8.
19. Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes Infect*. 5(13):1231-40. DOI:10.1016/j.micinf.2003.09.005.
20. Canela-Pérez I, López-Villaseñor I, Cevallos AM, Hernández R. (2018). Nuclear distribution of the *Trypanosoma cruzi* RNA Pol I subunit RPA31 during growth and metacyclogenesis, and characterization of its nuclear localization signal. *Parasitol Res*.117(3):911-918. DOI:10.1007/s00436-018-5747-4.
21. Canela-Pérez I, López-Villaseñor I, Mendoza L, Cevallos AM, Hernández R. (2019). Nuclear localization signals in trypanosomal proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 229:15-23. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2019.02.003.
22. Carod-Artal FJ. (2013). American trypanosomiasis. *Handb Clin Neurol*. 114:103-23. DOI: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00007-8.
23. Casanova M, Portalès P, Blaineau C, Crobu L, Bastien P, Pagès M.(2008), Inhibition of active nuclear transport is an intrinsic trigger of programmed cell death in trypanosomatids. *Cell Death Differ*.15(12):1910-20. DOI: 10.1038/cdd.2008.132.
24. Cassola A, Frasch AC. (2009). An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *J Biol Chem*. 284(50):35015-35028. DOI:10.1074/jbc.M109.031633.
25. Castro C, Hernández R, Castañeda M. (1981). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: Internal break in the large molecular mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol*. 2(3-4):219-33. DOI:10.1016/0166-6851(81)90102-x.
26. Cautain B, Hill R, de Pedro N, Link W. (2015). Components and regulation of nuclear transport processes. *FEBS J*.282(3):445-62. DOI:10.1111/febs.13163.
27. Cazalla D, Zhu J, Manche L, Huber E, Krainer AR, Cáceres JF. (2002). Nuclear export and retention signals in the RS domain of SR proteins. *Mol Cell Biol*.22(19):6871-82. DOI:10.1128/mcb.22.19.6871-6882.2002.
28. Cevallos AM, Pérez-Escobar M, Espinosa N, Herrera J, López-Villaseñor I, Hernández R. (2005). The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiol Lett*. 246(2):259-64. DOI:10.1016/j.femsle.2005.04.017.
29. Chang CW, Couñago RL, Williams SJ, Bodén M, Kobe B. (2012). Crystal structure of rice importin- α and structural basis of its interaction with plant-specific nuclear localization signals. *Plant Cell*. 24(12):5074-88. DOI: 10.1105/tpc.112.104422.
30. Chang CW, Couñago RM, Williams SJ, Boden M, Kobe B.(2013). The distribution of different classes of nuclear localization signals (NLSs) in diverse organisms and the

- utilization of the minor NLS-binding site in plant nuclear import factor importin- α . *Plant Signal Behav.* 8(10). pii: e25976. DOI: 10.4161/psb.25976.
31. Chang CW, Williams SJ, Couñago RM, Kobe B.(2014). Structural basis of interaction of bipartite nuclear localization signal from *Agrobacterium* VirD2 with rice importin- α . *Mol Plant.* 7(6):1061-1064. DOI: 10.1093/mp/ssu014.
 32. Chelsky D, Ralph R, Jonak G. (1989). Sequence requirements for synthetic peptide mediated translocation to the nucleus. *Mol Cell Biol.* 9(6):2487-2492. DOI: 10.1128/mcb.9.6.2487.
 33. Choi S, Yamashita E, Yasuhara N, Song J, Son SY, Won YH, Hong HR, Shin YS, Sekimoto T, Park IY, Yoneda Y, Lee SJ. (2014), Structural basis for the selective nuclear import of the C2H2 zinc-finger protein Snail by importin β . *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*70(Pt 4):1050-60. DOI:10.1107/S1399004714000972.
 34. Chook YM, Süel KE. (2011). Nuclear import by karyopherin- β s: recognition and inhibition. *Biochim Biophys Acta.*1813(9):1593-606. DOI:10.1016/j.bbamcr.2010.10.014.
 35. Christie M, Chang CW, Róna G, Smith KM, Stewart AG, Takeda AA, Fontes MR, Stewart M, Vértessy BG, Forwood JK, Kobe B.(2016). Structural Biology and Regulation of Protein Import into the Nucleus. *J Mol Biol.*428(10 Pt A):2060-90. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.10.023.
 36. Chung HM, Shea C, Fields S, Taub RN, Van der Ploeg LH, Tse DB. (1990). Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: Location of telomeres and mini-chromosomes. *EMBO J.* 9(8):2611-9. DOI.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07443.x.
 37. Ciganda M, Williams N. (2012). Characterization of a novel association between two trypanosome-specific proteins and 5S rRNA. *PLoS One.* 7(1):e30029. DOI:10.1371/journal.pone.0030029.
 38. Cingolani G, Bednenko J, Gillespie MT, Gerace L. (2002). Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Mol Cell.* 2002 Dec;10(6):1345-53. DOI:10.1016/s10972765(02)00727-x.
 39. Cingolani G, Petosa C, Weis K, Müller CW. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature.* 399(6733):221-9. DOI:10.1038/20367.
 40. Clayton C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol.* 9(6):190072. DOI: 10.1098/rsob.190072.
 41. Clayton J. (2010). Chagas disease 101. *Nature.* 465(7301):S4-5. DOI:10.1038/nature09220.
 42. Conti E, Kuriyan J. (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure.* 15;8(3):329-38. DOI:10.1016/s0969-2126(00)00107-6.
 43. Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J.(1998), Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell.* 94(2):193-204. DOI:10.1016/s0092-8674(00)81419-1.
 44. Cordingley JS. (1985). Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.*17(3):321-30. DOI:10.1016/0166-6851(85)90006-4.

45. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14(6):1188-90 DOI:10.1101/gr.849004.
46. Cruz-Reyes A, Pickering-López JM. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101(4):345-54. DOI:10.1590/s0074-02762006000400001.
47. de Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. (2010), Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol.* 2010;2010. pii: 295394. DOI:10.1155/2010/295394.
48. de Souza W, Meyer H. (1974). On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *J Protozool.* 21(1):48-52. DOI:10.1111/j.15507408.1974.tb03615.x.
49. de Souza W. (1984). Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol.* 86:197-283. DOI:10.1016/s0074-7696(08)60180-1
50. de Souza W. (1999). A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 Suppl 1:17-36. DOI:10.1590/s0074-02761999000700003.
51. de Souza W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8(4):269-85. DOI: 10.2174/1381612023396276.
52. Dean S, Sunter JD, Wheeler RJ. (2017). TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. *Trends Parasitol.* 33(2):80-82. DOI: 10.1016/j.pt.2016.10.009.
53. DeGrasse JA1, DuBois KN, Devos D, Siegel TN, Sali A, Field MC, Rout MP, Chait BT. (2009), Evidence for a shared nuclear pore complex architecture that is conserved from the last common eukaryotic ancestor. *Mol Cell Proteomics.* 8(9):2119-30. DOI: 10.1074/mcp.M900038-MCP200.
54. Deschamps P, Lara E, Marande W, López-García P, Ekelund F, Moreira D.(2011). Phylogenomic analysis of kinetoplasts supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Mol Biol Evol.* 28(1):53-8. DOI:10.1093/molbev/msq289.
55. Dey V, Patankar S.(2018). Molecular basis for the lack of auto-inhibition of Plasmodium falciparum importin α . *Biochem Biophys Res Commun.* 503(3):1792-1797. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.115.
56. Dias SM, Wilson KF, Rojas KS, Ambrosio AL, Cerione RA. (2009). The molecular basis for the regulation of the cap-binding complex by the importins. *Nat Struct Mol Biol.* 16(9):930-7. DOI: 10.1038/nsmb.1649.
57. Dimario PJ. (2004). Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. *Int Rev Cytol.* 239:99-178. DOI:10.1016/S0074-7696(04)39003-0.
58. Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, Roberts B, Richardson WD.(1988). The nucleoplasmic nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *J Cell Biol.* 107(3):841-9. DOI:10.1083/jcb.107.3.841.
59. dos Santos Júnior Ade C., Kalume DE, Camargo R, Gómez-Mendoza DP, Correa JR, Charneau S, de Sousa MV, de Lima BD, Ricart CA. (2015). Unveiling the *Trypanosoma cruzi* Nuclear Proteome. *PLoS One.* 10(9):e0138667. DOI:10.1371/journal.pone.0138667.

60. Dossin F de M, Schenkman S. (2005). Actively Transcribing RNA Polymerase II Concentrates on Spliced Leader Genes in the Nucleus of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell*. 4(5): 960–970. DOI: 10.1128/EC.4.5.960-970.2005.
61. Dubessay P, Blaineau C, Bastien P, Tasse L, Van Dijk J, Crobu L, Pagès M. (2006). Cell cycle-dependent expression regulation by the proteasome pathway and characterization of the nuclear targeting signal of a Leishmania major Kin-13 kinesin. *Mol Microbiol*. 59(4):1162-74. DOI:10.1111/j.1365-2958.2005.05013.x.
62. Elias MC, Faria M, Mortara RA, Motta MC, de Souza W, Thiry M, Schenkman S. (2002). Chromosome localization changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. *Eukaryot Cell*. 1(6):944-53. DOI:10.1128/ec.1.6.944-953.2002.
63. Elias MC, Marques-Porto R, Freymüller E, Schenkman S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Mol Biochem Parasitol*. 112(1):79-90. DOI:10.1016/s0166-6851(00)00349-2.
64. El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A, Sonnhammer ELL, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto SCE, Finn RD. (2019). *Nucleic Acids Res*. 47(D1):D427-D432. DOI: 10.1093/nar/gky995.
65. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*. 309(5733): 409-415. DOI:10.1126/science.1112631.
66. Ernst S, Müller-Newen G. (2019). Nucleocytoplasmic Shuttling of STATs. A Target for Intervention? *Cancers (Basel)*. 11(11). pii: E1815. DOI:10.3390/cancers11111815.
67. Esponda P, Souto-Padrón T, De Souza W. (1983). Fine structure and cytochemistry of the nucleus and the kinetoplast of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*. 30(1):105-10. DOI:10.1111/j.1550-7408.1983.tb01041.x.
68. Fahrenkrog B, Aebi U. (2003). The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4(10):757-66. DOI:10.1038/nrm1230.
69. Fatica A, Tollervey D. (2002). Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 14(3):313-8. DOI:10.1016/s0955-0674(02)00336-8.
70. Field MC, Carrington M. (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol*. 7(11):775-86. DOI: 10.1038/nrmicro2221.

71. Field MC, Rout MP. (2019). Pore timing: the evolutionary origins of the nucleus and nuclear pore complex. *F1000Res*.8. pii: F1000 Faculty Rev-369. DOI: 10.12688/f1000research.16402.1.
72. Fischer-Fantuzzi L, Vesco C. (1988). Cell-dependent efficiency of reiterated nuclear signals in a mutant simian virus 40 oncoprotein targeted to the nucleus. *Mol Cell Biol*. 8(12):5495-503. DOI:10.1128/mcb.8.12.5495.
73. Fontes MR, Teh T, Jans D, Brinkworth RI, Kobe B. (2003). Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J Biol Chem*. 278(30):27981-7. DOI:10.1074/jbc.M303275200.
74. Fontes MR, Teh T, Kobe B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol*.297(5):1183-94. DOI:10.1006/jmbi.2000.3642.
75. Fournier D, Palidwor GA, Shcherbinin S, Szengel A, Schaefer MH, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA. (2013). Functional and genomic analyses of alpha-solenoid proteins. *PLoS One*. 8(11):e79894. DOI:10.1371/journal.pone.0079894.
76. Fox AH, Lamond AI. (2010). Paraspeckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(7):a000687. DOI: 10.1101/cshperspect.a000687.
77. Gao R, Wong SM. (2013). Basic amino acid mutations in the nuclear localization signal of hibiscus chlorotic ringspot virus p23 inhibit virus long distance movement. *PLoS One*.8(9):e74000. DOI:10.1371/journal.pone.0074000.
78. Garcia ES, Azambuja P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 7(9):240-4. DOI:10.1016/0169-4758(91)90237-i.
79. Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS.(2003). The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation.*Curr Opin Cell Biol*.15(3):318-25. DOI:10.1016/s0955-0674(03)00049-8.
80. Girke P, Seufert W. (2019). Compositional reorganization of the nucleolus in budding yeast mitosis. *Mol Biol Cell*. 30(5):591-606. DOI:10.1091/mbc.E18-08-0524.
81. Gluenz E, Taylor M, Kelly J. (2007). The *Trypanosoma cruzi* metacyclic-specific protein Met-III associates with the nucleolus and contains independent amino and carboxyl terminal targeting elements. *Int J Parasitol*. 37 (6): 617-25. DOI:10.1016/j.ijpara.2006.11.016.
82. Goldfarb D., Corbett A., Mason D., Harreman M., Adam S. (2004). Importin a: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*.14 (9): 505-514. DOI:10.1016/j.tcb.2004.07.016.
83. Gonçalves CS, Ávila AR, de Souza W, Motta MCM, Cavalcanti DP. (2018). Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasit Vectors*. 11(1):83. DOI: 10.1186/s13071-018-2664-4.
84. Goodfellow SJ, Zomerdijk JC. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem*. 61:211-36. DOI: 10.1007/978-94-007-4525-4_10.
85. Goos C, Dejung M, Janzen CJ, Butter F, Kramer S. (2017). The nuclear proteome of *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*. 12(7):e0181884. DOI:10.1371/journal.pone.0181884.

86. Görlich D, Panté N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* 15(20):5584-94. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00943.x>.
87. Grummt I. (2013). The nucleolus—guardian of cellular homeostasis and genome integrity. *Chromosoma.* 122(6):487-97. DOI:10.1007/s00412-013-0430-0.
88. Gunzl A, Vanhamme L, Myler PJ (2007). Transcription in trypanosomes: A different means to the end. In *Trypanosomes: After the Genome*; Barry, J.D., McCulloch, R., Mottram, J.C., Acosta-Serrano, A., Eds.; Horizon Bioscience: Wymonham, UK, pp. 177–208.
89. Hayama R, Rout MP, Fernandez-Martinez J. (2017). The nuclear pore complex core scaffold and permeability barrier: variations of a common theme., *Curr Opin Cell Biol.*,46:110-118. DOI:10.1016/j.ceb.2017.05.003.
90. Heix J, Vente A, Voit R, Budde A, Michaelidis TM, Grummt I. (1998), Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *EMBO J.*17(24):7373-81. DOI:10.1093/emboj/17.24.7373.
91. Hernández R, Cevallos AM, Nepomuceno-Mejía T, López-Villaseñor I. (2012). Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitol Res.* 2012 Aug;111(2):509-14. DOI:10.1007/s00436-012-2974-y.
92. Hernández R, Cevallos AM. (2014). Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. *Parasitol Res.*113(7):2415-24. DOI: 10.1007/s00436-014-3940-7.
93. Hernández R, Díaz-de León F, Castañeda M. (1988), Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 27(2-3):275-9. DOI:10.1016/0166-6851(88)90047-3.
94. Hernández R, Martínez-Calvillo S, Hernandez-Rivas R, Gomez E. (1993). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol Res.* 26(1-2):109-14.
95. Hernández-Rivas R, Martínez-Calvillo S, Romero M, Hernández R.(1992). *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol Lett.*71(1):63-7. DOI:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05235.x.
96. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DL. (2010). The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA.*1(3):415-31. DOI:10.1002/wrna.39.
97. Hodel MR, Corbett AH, Hodel AE. (2001). Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem.* 276(2):1317-25. DOI:10.1074/jbc.M008522200.
98. Hoek M, Engstler M, Cross GA. (2000). Expression-site-associated gene 8 (ESAG8) of *Trypanosoma brucei* is apparently essential and accumulates in the nucleolus. *J Cell Sci.* 113 (Pt 22) :3959-3968.
99. Hoelz A, Blobel G. (2004). Cell biology: popping out of the nucleus. *Nature.*432(7019):815-6. DOI:10.1038/432815a.
100. Hoelz A, Glavy JS, Beck M. (2016). Toward the atomic structure of the nuclear pore complex: when top down meets bottom up. *Nat Struct Mol Biol.*23(7):624-30. DOI:10.1038/nsmb.3244.

101. Huang, S. (2002). Building an efficient factory: Where is prerRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol.* 157(5):739-41. DOI:10.1083/jcb.200204159.
102. Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* 425(6959):686-691. DOI:10.1038/nature02026.
103. Hunter CC, Siebert KS, Downes DJ, Wong KH, Kreutzberger SD, Fraser JA, Clarke DF, Hynes MJ, Davis MA, Todd RB. (2014). Multiple Nuclear Localization Signals Mediate Nuclear Localization of the GATA Transcription Factor AreA. *Eukaryot Cell.* 13(4): 527–538. DOI:10.1128/EC.00040-14.
104. Izaurrealde E, Kutay U, von Kobbe C, Mattaj IW, Görlich D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.*16(21):6535-47. DOI:10.1093/emboj/16.21.6535.
105. Jäkel S1, Görlich D.(1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.*17(15):4491-502. DOI:10.1093/emboj/17.15.4491.
106. Jans DA, Martin AJ, Wagstaff KM.(2019). Inhibitors of nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol.*58:50-60. DOI: 10.1016/j.ceb.2019.01.001.
107. Jensen RE., Englund PT. (2012). Network news: the replication of kinetoplast DNA, *Annu Rev Microbiol.* 66: 473-491. DOI: 10.1146/annurev-micro-092611-150057.
108. Jiménez-García LF, Elizundia JM, López-Zamorano B, Maciel A, Zavala G, Echeverría OM, Vázquez-Nin GH. (1989). Implications for evolution of nuclear structures of animals, plants, fungi and protoctists. *Biosystems.* 22(2):103-16. DOI:10.1016/0303-2647(89)90039-7.
109. Jovanovic-Talisman T, Tetenbaum-Novatt J, McKenney AS, Zilman A, Peters R, Rout MP, Chait BT. (2009), Artificial nanopores that mimic the transport selectivity of the nuclear pore complex. *Nature.*457(7232):1023-7. DOI: 10.1038/nature07600.
110. Kalab P, Heald R. (2008). The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *J Cell Sci.*121(Pt 10):1577-86. DOI: 10.1242/jcs.005959.
111. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell.* 39(3 Pt 2):499-509. DOI:10.1016/0092-8674(84)90457-4.
112. Kambach C, Mattaj IW. (1994). Nuclear transport of the U2 snRNP-specific U2B'' protein is mediated by both direct and indirect signalling mechanisms. *J Cell Sci.* 107 (Pt 7):1807-16.
113. Kelly S, Wickstead B, Gull K. (2005). An *in silico* analysis of trypanosomatid RNA polymerases: insights into their unusual transcription. *Biochem Soc Trans.* 33(Pt 6):1435-7. DOI:10.1042/BST20051435.
114. Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. (1992). A shuttle vector wich facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic acids Res.* 20 (15):3963-3969. DOI: 10.1093/nar/20.15.3963.
115. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 10(6):845-58. DOI:10.1038/nprot.2015.053.

116. Kim SJ, Fernandez-Martinez J, Nudelman I, Shi Y, Zhang W, Raveh B, Herricks T, Slaughter BD, Hogan JA, Upla P, Chemmama IE, Pellarin R, Echeverria I, Shivaraju M, Chaudhury AS, Wang J, Williams R, Unruh JR, Greenberg CH, Jacobs EY, Yu Z, de la Cruz MJ, Mironska R, Stokes DL, Aitchison JD, Jarrold MF, Gerton JL, Ludtke SJ, Akey CW, Chait BT, Sali A, Rout MP. (2018). Integrative structure and functional anatomy of a nuclear pore complex. *Nature.*, 555(7697):475-482. DOI:10.1038/nature26003.
117. King MC, Lusk CP, Blobel G. (2006). Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature.*442(7106):1003-7. DOI:10.1038/nature05075.
118. Kirkham JK, Park SH, Nguyen TN, Lee JH, Günzl A.(2015). Dynein Light Chain LC8 Is Required for RNA Polymerase I-Mediated Transcription in *Trypanosoma brucei*, Facilitating Assembly and Promoter Binding of Class I Transcription Factor A. *Mol Cell Biol.* 36(1):95-107. DOI:10.1128/MCB.00705-15.
119. Kobe B.(1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol.* 6(4):388-97. DOI:10.1038/7625.
120. Kosugi S, Hasebe M, Entani T, Takayama S, Tomita M, Yanagawa H. (2008) Design of peptide inhibitors for the importin alpha/beta nuclear import pathway by activity-based profiling. *Chem Biol.* 15(9):940-9. DOI:10.1016/j.chembiol.2008.07.019.
121. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, Yanagawa H. (2009a). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem.* 284(1):478-85. DOI: 10.1074/jbc.M807017200.
122. Kosugi S, Hasebe M, Tomita M, Yanagawa H. (2009b). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A.*106(25):10171-6. DOI: 10.1073/pnas.0900604106.
123. Koumandou VL, Wickstead B, Ginger ML, van der Giezen M, Dacks JB, Field MC. (2013). Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 48(4):373-96. DOI:10.3109/10409238.2013.821444.
124. Kumar D, Kumar D, Saha S. (2012). A highly basic sequence at the N-terminal region is essential for targeting the DNA replication protein ORC1 to the nucleus in *Leishmania donovani*. *Microbiology.*158(Pt 7):1775-1782. DOI:10.1099/mic.0.055640-0.
125. Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R, Görlich D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell.*90(6):1061-71. DOI:10.1016/s0092-8674(00)80372-4.
126. Lam YW, Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. (2005). The nucleolus. *J Cell Sci.*118(Pt 7):1335-7. DOI:10.1242/jcs.01736.
127. Lamond AI, Earnshaw WC. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science.* 280(5363):547-53. DOI:10.1126/science.280.5363.547.
128. Landeira D, Navarro M. (2007). Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*, *J Cell Biol.* 176(2): 133–139. DOI:10.1083/jcb.200607174.

129. Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH. (2007). Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem.* 282(8):5101-5105. DOI:10.1074/jbc.R600026200.
130. Lange A, Mills RE, Devine SE, Corbett AH. (2008). A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *J Biol Chem.* 283(19):12926-34. DOI: 10.1074/jbc.M800898200.
131. Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG. (2013). Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108 Suppl 1:34-47. DOI:10.1590/0074-0276130409.
132. Lee BJ, Cansizoglu AE, Süel KE, Louis TH, Zhang Z, Chook YM. (2006a). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell.*126(3):543-58. DOI:10.1016/j.cell.2006.05.049.
133. Lee C, Hodgins D, Calvert JG, Welch SK, Jolie R, Yoo D. (2006b), Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology.*346(1):238-50. DOI:10.1016/j.virol.2005.11.005.
134. Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, Nagoshi E, Nakagawa A, Imamoto N, Yoshimura M, Sakai H, Chong KT, Tsukihara T, Yoneda Y. (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science.*302(5650):1571-5. DOI:10.1126/science.1088372.
135. Lee YJ, Lee C. (2015). Ivermectin inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cultured porcine alveolar macrophages. *Arch Virol.* 2016 Feb;161(2):257-68. DOI:10.1007/s00705-015-2653-2.
136. Leung AK, Gerlich D, Miller G, Lyon C, Lam YW, Lleres D, Daigle N, Zomerdijk J, Ellenberg J, Lamond AI. (2004). Quantitative kinetic analysis of nucleolar breakdown and reassembly during mitosis in live human cells. *J Cell Biol.*166(6):787-800. DOI:10.1083/jcb.200405013.
137. Leung SW, Harreman MT, Hodel MR, Hodel AE, Corbett AH. (2003). Dissection of the karyopherin alpha nuclear localization signal (NLS)-binding groove: functional requirements for NLS binding. *J Biol Chem.* 278(43):41947-53. DOI:10.1074/jbc.M307162200.
138. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health.* 7:166. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00166.
139. Lim RY, Fahrenkrog B. (2006). The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol.*18(3):342-7. DOI:10.1016/j.ceb.2006.03.006.
140. Lips S, Geuskens M, Paturiaux-Hanocq F, Hanocq-Quertier J, Pays E. (1996). The esag 8 gene of *Trypanosoma brucei* encodes a nuclear protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 79(1):113-7. DOI:10.1016/0166-6851(96)02638-2.
141. López-Velázquez G, Hernández R, López-Villaseñor I, Reyes-Vivas H, Segura-Valdez Mde L, Jiménez-García LF. (2005). Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal.* 11 (4): 293-299. DOI:10.1017/S1431927605050233.

142. Lott K, Cingolani G. (2011). The importin β binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim Biophys Acta*.1813(9):1578-92. DOI:10.1016/j.bbamcr.2010.10.012.
143. Lukeš J., Skalický T., Týc J , Votýpka J, Yurchenko Y. (2014). Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Mol Biochem Parasitol*. 195 (2): 115-122. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.05.007.
144. Lundberg L, Pinkham C, Baer A, Amaya M, Narayanan A, Wagstaff KM, Jans DA, Kehn-Hall K. (2013). Nuclear import and export inhibitors alter capsid protein distribution in mammalian cells and reduce Venezuelan Equine Encephalitis Virus replication. *Antiviral Res*. 100(3):662-72. DOI:10.1016/j.antiviral.2013.10.004.
145. Ma J, Goryaynov A, Yang W. (2016). Super-resolution 3D tomography of interactions and competition in the nuclear pore complex. *Nat Struct Mol Biol*. 23(3):239-47. DOI: 10.1038/nsmb.3174.
146. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(1):1-12. DOI:10.1590/s0074-02762004000100001.
147. Makkerh JP, Dingwall C, Laskey RA. (1996). Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol*.6(8):1025-7. DOI:10.1016/s0960-9822(02)00648-6.
148. Mao YS, Zhang B, Spector DL. (2011). Biogenesis and Function of Nuclear Bodies, *Trends Genet*. 27(8): 295–306. DOI: 10.1016/j.tig.2011.05.006.
149. Marchetti MA, Tschudi C, Kwon H, Wolin SL, Ullu E. (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J Cell Sci*. 113 (Pt 5): 899-906.
150. Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NF, Curmi PM, Forwood JK, Bodén M, Kobe B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*.1813 (9):1562-1577. DOI:10.1016/j.bbamcr.2010.10.013.
151. Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010:525241. DOI: 10.1155/2010/525241.
152. Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*.135(6 Pt 1):1457-70. DOI:10.1083/jcb.135.6.1457.
153. Maugeri DA, Cannata JJ, Cazzulo JJ.(2011). Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Essays Biochem*. 51, 15-30. DOI: 10.1042/bse0510015.
154. Mayol GF, Revuelta MV, Salusso A, Touz MC, Rópolo AS. (2020). *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. Evidence of nuclear transport mechanisms in the protozoan parasite *Giardia lamblia*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1867(1):118566. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.118566.
155. Mèlèse T, Xue Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome: *Curr Opin Cell Biol*. 7 (3): 319-324. DOI:10.1016/0955-0674(95)80085-9.

156. Melnikov S, Ben-Shem A, Garreau de Loubresse N, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. (2012). One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol.*19(6):560-7. DOI:10.1038/nsmb.2313.
157. Moreno-Campos R, Florencio-Martínez LE, Nepomuceno-Mejía T, Rojas-Sánchez S, Vélez-Ramírez DE, Padilla-Mejía NE, Figueroa-Angulo E, Manning-Cela R, Martínez-Calvillo S. (2016). Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology.*143(14):1917-1929. DOI:10.1017/S0031182016001712.
158. Moroianu J, Blobel G, Radu A. (1996). Nuclear protein import: Ran-GTP dissociates the karyopherin alpha beta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(14):7059-62. DOI:10.1073/pnas.93.14.7059.
159. Mosgoeller W. (2004). Nucleolar ultrastructure in vertebrates. en: Olson MOJ (ed) *The nucleolus*. Landes Biosciences. 10-20.
160. Nakai K, Horton P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization., *Trends Biochem Sci.*, 24(1):34-36 DOI:10.1016/s0968-0004(98)01336-x.
161. Nardelli SC, Avila AR, Freund A, Motta MC, Manhães L, de Jesus TC, Schenkman S, Fragoso SP, Krieger MA, Goldenberg S, Dallagiovanna B. (2007). Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell.* 6(2):337-45. DOI:10.1128/EC.00279-06.
162. Navarro M, Gull K. (2001). A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):759-63. DOI:10.1038/414759a.
163. Navarro M, Peñate X, Landeira D. (2007). Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol.* 15(6):263-70. DOI: 10.1016/j.tim.2007.04.004.
164. Nepomuceno-Mejía T, Lara-Martínez R, Cevallos AM, López-Villaseñor I, Jiménez-García LF, Hernández R. (2010). The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiol Lett.* 313(1):41-6. DOI:10.1111/j.1574-6968.2010.02117.x.
165. Nepomuceno-Mejía T, Lara-Martínez R, Hernández R, Segura-Valdez Mde L, Jiménez-García LF.(2016). Nucleologenesis in *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal.*22(3):621-9. DOI:10.1017/S1431927616000623.
166. Nguyen N., Schimanski B., Gunzl A. (2007). Active RNA Polymerase I of *Trypanosoma brucei* Harbors a Novel Subunit Essential for Transcription, *Molecular and Cellular Biology*, 27(17):6254-63. DOI:10.1128/MCB.00382-07.
167. Nguyen T., Schimanski B., Zahn A., Klumpp B., Gunzl A. (2006). Purification of an eight subunit RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*, *Mol Biochem Parasitol.* 149(1):27-37. DOI:10.1016/j.molbiopara.2006.02.023.
168. Nguyen TN, Müller LS, Park SH, Siegel TN, Günzl A. (2014). Promoter occupancy of the basal class I transcription factor A differs strongly between active and silent VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 2014 Mar;42(5):3164-76. DOI:10.1093/nar/gkt1301.

169. Nguyen TN, Nguyen BN, Lee JH, Panigrahi AK, Günzl A. (2012). Characterization of a novel class I transcription factor A (CITFA) subunit that is indispensable for transcription by the multifunctional RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*. 11(12):1573-81. DOI:10.1128/EC.00250-12.
170. Nigg EA.(1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*.386(6627):779-87. DOI:10.1038/386779a0.
171. Norman FF, López-Vélez R. (2013). Chagas disease and breast-feeding. *Emerg Infect Dis*. 19(10):1561-6. DOI: 10.3201/eid1910.130203.
172. Nunes MC, Barbosa MM, Ribeiro AL, Barbosa FB, Rocha MO. (2009). Ischemic cerebrovascular events in patients with Chagas cardiomyopathy: a prospective follow-up study. *J Neurol Sci*. 278(1-2):96-101. DOI:10.1016/j.jns.2008.12.015.
173. Nunes VS, Moretti NS. (2017). Nuclear subcompartments: an overview. *Cell Biol Int*. 41(1):2-7. DOI: 10.1002/cbin.10703.
174. Obado SO, Brillantes M, Uryu K, Zhang W, Ketaren NE, Chait BT, Field MC, Rout MP. (2016). Interactome Mapping Reveals the Evolutionary History of the Nuclear Pore Complex. *PLoS Biol*. 14(2):e1002365. DOI:10.1371/journal.pbio.1002365.
175. Obado SO, Field MC, Rout MP. (2017). Comparative interactomics provides evidence for functional specialization of the nuclear pore complex. *Nucleus*. 8(4):340-352. DOI:10.1080/19491034.2017.1313936.
176. Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T, Gull K. (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma*. 108 (8): 501-513 DOI:10.1007/s004120050402.
177. Oka M, Yoneda Y. (2018). Importin α : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*.94(7):259-274. DOI:10.2183/pjab.94.018.
178. Olson M. (2010). Introduction. en: Olson MOJ (ed) *The nucleolus*. Landes Bioscience. Austin.1-9.
179. OMS (2019), La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana), Nota descriptiva.
180. Opperdoes FR, Michels PA. (1993). The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochimie*. 75(3-4):231-4. DOI:10.1016/0300-9084(93)90081-3.
181. Panchal M, Rawat K, Kumar G, Kibria KM, Singh S, Kalamuddin M, Mohammed A, Malhotra P, Tuteja R. (2014). Plasmodium falciparum signal recognition particle components and anti-parasitic effect of ivermectin in blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of SRP. *Cell Death Dis*. 5:e994. DOI: 10.1038/cddis.2013.521.
182. Paule MR, White RJ. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*. 28(6):1283-98. DOI:10.1093/nar/28.6.1283.
183. Pérez-Molina JA, Molina I. (2018). Chagas disease. *Lancet*. 391(10115):82-94. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
184. Pettitt J, Harrison N, Stansfield I, Connolly B, Müller B. (2010). The evolution of spliced leader trans-splicing in nematodes. *Biochem Soc Trans*. 38(4):1125-30. DOI:10.1042/BST0381125.
185. Pinto AY, Valente S, Valente V, Júnior A, Coura J. (2008). Acute phase of chagas disease in the brazilian amazon region; study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhao observed between 1988 and 2005, *Rev Soc Bras Med Trop*. 41 (6): 602-614.

186. Prada CF, Álvarez-Velilla R, Díaz-Gozález R, Pérez-Pertejo Y, Balaña-Fouce R, Reguera RM. (2013). Identification and characterization of the regions involved in the nuclear translocation of the heterodimeric leishmanial DNA topoisomerase IB. *PLoS One*. 8(9):e73565. DOI:10.1371/journal.pone.0073565.
187. Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 1(2):92-100. DOI:10.1016/S1473-3099(01)00065-2.
188. Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R. (2005). InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res*. 33(Web Server issue):W116-20. DOI:10.1093/nar/gki442
189. Ramakrishnan V. (2014). The ribosome emerges from a black box. *Cell*.159(5):979-984. DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.052.
190. Ramsey JM, Peterson AT, Carmona-Castro O, Moo-Llanes DA, Nakazawa Y, Butrick M, Tun-Ku E, la Cruz-Félix Kd, Ibarra-Cerdeña CN. (2015). Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.110(3):339-52. DOI: 10.1590/0074-02760140404.
191. Rangel-Gamboa L, López-García L, Moreno-Sánchez F, Hoyo-Ulloa I, Vega-Mémije ME, Mendoza-Bazán N, Romero-Valdovinos M, Olivo-Díaz A, Villalobos G, Martínez-Hernández F. (2019). *Trypanosoma cruzi* infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas disease. *Parasit Vectors*. 12(1):506. DOI: 10.1186/s13071-019-3766-3.
192. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 26(2):275-291. DOI: 10.1016/j.idc.2012.03.002.
193. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA.(2010). Chagas disease. *Lancet*. 375(9723):1388-1402. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X.
194. Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MO. (2012). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. 9(10):576–89. DOI:10.1038/nrcardio.2012.109.
195. Riggelman B, Wieschaus E, Schedl P.(1989). Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes Dev*.3(1):96-113. DOI:10.1101/gad.3.1.96.
196. Ritterhoff T, Das H, Hofhaus G, Schröder RR, Flotho A, Melchior F. (2016). The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 SUMO E3 ligase is a disassembly machine for Crm1-dependent nuclear export complexes. *Nat Commun*.7:11482. DOI: 10.1038/ncomms11482.
197. Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*. 64(3):615-23. DOI:10.1016/0092-8674(91)90245-t.
198. Rout MP, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT (2000), The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol*. 148(4):635-51. DOI:10.1083/jcb.148.4.635.

199. Rout MP, Field MC. (2001). Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. Identification of a major repetitive nuclear lamina component. *J Biol Chem.* 276(41):38261-71. DOI:10.1074/jbc.M104024200.
200. Russell J, Zomerdijk JC. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci.* 30(2):87-96. DOI:10.1016/j.tibs.2004.12.008.
201. Scarim CB, Jornada DH, Chelucci RC, de Almeida L, Dos Santos JL, Chung MC. (2018). Current advances in drug discovery for Chagas disease. 155:824-838. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.06.040.
202. Sadian Y, Baudin F, Tafur L, Murciano B, Wetzel R, Weis F, Müller CW. (2019). Molecular insight into RNA polymerase I promoter recognition and promoter melting. *Nat Commun.*10(1):5543. DOI: 10.1038/s41467-019-13510-w.
203. Sambrook y Russell (2001), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Protocol 25: 1.116.
204. Schimanski B., Nguyen T., Gunzl A. (2005). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* 25(16):7303-13. DOI:10.1128/MCB.25.16.7303-7313.2005.
205. Schöfer C, Weipoltshammer K. (2018). Nucleolus and chromatin. *Histochem Cell Biol.*150(3):209-225. DOI:10.1007/s00418-018-1696-3.
206. Schofield CJ, Galvão C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 2009 110(2-3):88-100. DOI:10.1016/j.actatropica.2009.01.010
207. Schuller AP, Green R. (2019). Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*19(8):526-541. DOI:10.1038/s41580-018-0011-4.
208. Secretaría de salud de México (2019), *Manual de procedimientos para la enfermedad de chagas en México*.
209. Seewald MJ, Körner C, Wittinghofer A, Vetter IR. (2002). RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature.*415(6872):662-6. DOI:10.1038/415662a.
210. Sengupta T, Mukherjee M, Mandal C, Das A, Majumder HK. (2003). Functional dissection of the C-terminal domain of type II DNA topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res.*31(18):5305-16. DOI:10.1093/nar/gkg727.
211. Shulamit M. (2011). Trans-splicing in Trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future microbiol.* 6 (4): 459-74. DOI: 10.2217/fmb.11.20.
212. Siomi H, Dreyfuss G. (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol.*129(3):551-60. DOI:10.1083/jcb.129.3.551.
213. Smith HM, Hicks GR, Raikhel NV. (1997). Importin alpha from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol.* 114(2):411-7. DOI:10.1104/pp.114.2.411.
214. Steverding D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasit Vectors.*7:317. DOI: 10.1186/1756-3305-7-317.
215. Stewart M, Rhodes D. (1999). Switching affinities in nuclear trafficking. *Nat Struct Biol.*6(4):301-4. DOI:10.1038/7529.

216. Stewart M. (2000). Insights into the molecular mechanism of nuclear trafficking using nuclear transport factor 2 (NTF2). *Cell Struct Funct.* 25(4):217-25. DOI:10.1247/csf.25.217.
217. Stewart M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.*8(3):195-208. DOI:10.1038/nrm2114.
218. Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.*11(7):490-501. DOI: 10.1038/nrm2928.
219. Strasser A, Dickmanns A, Lührmann R, Ficner R. (2005). Structural basis for m3G-cap-mediated nuclear import of spliceosomal UsnRNPs by snurportin1. *EMBO J.*24(13):2235-43. DOI:10.1038/sj.emboj.7600701.
220. Sun Y, Xian L, Xing H, Yu J, Yang Z, Yang T, Yang L, Ding P. (2016). Factors influencing the nuclear targeting ability of nuclear localization signals. *J Drug Target.*24(10):927-933. DOI:10.1080/1061186X.2016.1184273.
221. Tay MY, Fraser JE, Chan WK, Moreland NJ, Rathore AP, Wang C, Vasudevan SG, Jans DA. (2013). Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1-4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. *Antiviral Res.* 99(3):301-6. DOI:10.1016/j.antiviral.2013.06.002.
222. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. (2012). Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(8):e1749. DOI:10.1371/journal.pntd.0001749.
223. Thomas S, Green A, Sturm NR, Campbell DA, Myler PJ. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics.* 10:152. DOI: 10.1186/1471-2164-10-152.
224. Trinkle-Mulcahy L, Lamond AI. (2007). Toward a high-resolution view of nuclear dynamics. *Science.*318(5855):1402-7. DOI:10.1126/science.1142033.
225. Troncon LE, Aprile LR, Oliveira RB, Iazigi N. (2000). Abnormally rapid gastric emptying of an isosmotic liquid meal in patients with megaduodenum. *Dig Dis Sci.* 45(11):2145-50. DOI:10.1023/a:1026684418333.
226. Tschochner H, Hurt E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13(5):255-63. DOI:10.1016/s0962-8924(03)00054-0.
227. Vannini A, Cramer P.(2012). Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell.* 45(4):439-46. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.01.023.
228. Velasco A, Morillo CA. (2018). Chagas heart disease: A contemporary review. *J Nucl Cardiol.* DOI: 10.1007/s12350-018-1361-1.
229. Velasco-Castrejón O., Rivas-Sánchez B. (2008). Apuntes para la enfermedad de chagas en México. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 65 (1): 57-79.
230. Venema J, Tollervey D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet.*33:261-311. DOI:10.1146/annurev.genet.33.1.261.
231. Vetter IR, Nowak C, Nishimoto T, Kuhlmann J, Wittinghofer A. (1999). Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature.*398(6722):39-46. DOI:10.1038/17969.

232. Voit R, Seiler J, Grummt I. (2015). Cooperative Action of Cdk1/cyclin B and SIRT1 Is Required for Mitotic Repression of rRNA Synthesis. *PLoS Genet.*11(5):e1005246. DOI:10.1371/journal.pgen.1005246.
233. Vorländer MK, Khatter H, Wetzell R, Hagen WJH, Müller CW. (2018). Molecular mechanism of promoter opening by RNA polymerase III. *Nature.* 553(7688):295-300. DOI: 10.1038/nature25440.
234. Wagner W, So M. (1990). Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. *Infect Immun.* 58(10):3217-24.
235. Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. (2012). Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 443(3):851-6. DOI: 10.1042/BJ20120150.
236. Walgraffe D, Devaux S, Lecordier L, Dierick JF, Dieu M, Van den Abbeele J, Pays E, Vanhamme L. (2005). Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.*139(2):249-60. DOI:10.1016/j.molbiopara.2004.11.014.
237. Warner JR. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci.* 24(11):437-40. DOI:10.1016/s0968-0004(99)01460-7.
238. Weiser MF. (2015). Protozoa and human disease. *Trop Parasitol.* 5 (2): 142-143.
239. Westergaard G., Bercovich N., Reinert M., Vazquez M. (2010). Analysis of a nuclear localization signal in the p14 splicing factor in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 40 (9): 1029-1035. DOI:10.1016/j.ijpara.2010.02.011.
240. Wirthmueller L, Roth C, Fabro G, Caillaud MC, Rallapalli G, Asai S, Sklenar J, Jones AM, Wiermer M, Jones JD, Banfield MJ. (2015). Probing formation of cargo/importin- α transport complexes in plant cells using a pathogen effector. *Plant J.*81(1):40-52. DOI: 10.1111/tpj.12691.
241. Xu L, Massagué J. (2004), Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(3):209-19. DOI:10.1038/nrm1331.
242. Yang SN, Takeda AA, Fontes MR, Harris JM, Jans DA, Kobe B. (2010). Probing the specificity of binding to the major nuclear localization sequence-binding site of importin-alpha using oriented peptide library screening. *J Biol Chem.* 285(26):19935-46. DOI: 10.1074/jbc.M109.079574.
243. Yano R, Oakes M, Yamagishi M, Dodd JA, Nomura M. (1992), Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature-sensitive RNA polymerase I mutations, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*12(12):5640-51. DOI:10.1128/mcb.12.12.5640.
244. Yusupova G, Yusupov M. (2017). Crystal structure of eukaryotic ribosome and its complexes with inhibitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 372(1716). pii: 20160184. DOI: 10.1098/rstb.2016.0184.

10. APÉNDICE

Composición de amortiguadores y medios utilizados en este trabajo

Amortiguador fosfato salino (PBS)

- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na₂HPO₄ 1.44 g
- KH₂PO₄ 0.24 g
- Se aforó a 1 L con agua desionizada y se esterilizó en autoclave

Amortiguador TBE (5x)

- Tris base 54 g
- H₃BO₃ 27.4 g
- EDTA 4.65 g
- Se aforó a 1 L con agua desionizada
- Amortiguador TE (10,0.2)
- 10mM Tris pH 7.4
- 0.2mM EDTA pH 7.2

Medio LB líquido

- Bacto-triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g
- Se aforó a 1L con agua desionizada
- Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y se esterilizó en autoclave

Medio LB Agar

- A 1 L de Medio LB líquido se le agregaron 15 g de bacto agar.

Medio LIT (Liver Infusion triptone medium)

- NaCl 4 g
- KCl 0.4 g
- Na₂HPO₄ 8 g
- Glucosa 2 g
- Triptosa 5 g

- Liver infusion broth 5 g
- Se ajustó el pH a pH 7.2 con HCl concentrado
- Se aforó a 1 L con agua desionizada y se esterilizó en autoclave

Medio SOC

- Triptona 20g
- Extracto de levadura 5g
- NaCl 0.5g
- Se disolvió en 950 mL de agua desionizada
- KCl 250mM 10mL
- Se llevó a un volumen de 980 mL
- Se ajustó el pH 7 con NaOH 5M y se esterilizó en autoclave.
- Se agregaron 10 mL de MgCl₂ y 10 mL de glucosa 2 M a una temperatura de 55 °C (se esterilizó por filtración con una membrana de poro de 0.22 µm).

Medio YT2X

- Bactotriptona 1.6%
- Extracto de levadura 1%
- NaCl 0.5%
- Se ajustó el pH a 7.2 y se esterilizó en autoclave.

TB con DMSO

- PIPES 0.15 g
- CaCl₂ 0.11 g
- KCl 0.93 g
- MnCl₂ 0.54 g
- Se aforó a 50 mL
- Se disolvió en agua desionizada, y se ajustó el pH a 6.7 con KOH 1 N
- Se filtró con filtros de 0.45 µm (Millipore)
- Al botón celular se le agregó DMSO a una concentración final de 7%