

Trabajo final de graduación

**“Dinámica evolutiva de los minicírculos mitocondriales y
los ARN guías encargados de la edición de ARNm
mitocondriales en *Trypanosoma cruzi*”**

Para optar por el título de grado en Licenciatura en Ciencias Biológicas

Autor: Tatiana M, E, Ponce

Director: Nicolás Tomasini

Co-director: Sergio Díaz

Laboratorio: Instituto de Patología Experimental – IPE, Salta

Año: 2021

Agradecimientos

A Nicolás, que sin conocerme me dio la oportunidad de trabajar juntos en este proyecto. Un gran guía, supo transmitirme sus conocimientos con mucha paciencia y dedicación. Más que agradecida con sus enseñanzas y sus buenos comentarios.

A mi familia, a quienes les fallé en los cumpleaños, en los días especiales, en los festejos... y han sabido entender. Gracias por el apoyo incondicional.

A Matías, mi esposo, mi compañero, quien se ha llevado la peor parte, mis llantos, mis nervios, mis frustraciones y, sin embargo, siempre estuvo a mi lado. Gracias por hacerme sentir que todo está bien.

A Sergio, que aceptó el desafío en este trabajo y estuvo siempre a disposición. Gracias por su apoyo.

A mi familia política, quienes chocaron sus copas por cada pequeño logro que he tenido.

A mis amigos, los de antes y los de ahora, a los que quiero siempre. Gracias por estar.

Al Instituto de Patología Experimental y a toda la gente que forma parte de él. Gracias por recibirme y hacerme sentir parte del grupo aún sin conocerme.

Resumen

El protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* es de gran importancia en el norte de Argentina por ser el agente causal de la enfermedad de Chagas. Esta especie está clasificada en seis principales Unidades Discretas de Tipificación (UDT), designadas como TcI-TcVI, y un séptimo linaje identificado en murciélagos (TcBat), mostrando una gran heterogeneidad genética.

T. cruzi pertenece al grupo de los kinetoplástitos, caracterizado por la presencia de una única mitocondria. El ADN de esta organela, conocido como ADN kinetoplástico (ADNk), tiene una organización estructural única, con dos tipos de moléculas circulares concatenadas formando redes complejas. En esta especie existen entre 20-50 maxicírculos (≈ 36 kb) y 20.000-30.000 minicírculos ($\approx 1,42$ kb). Estos últimos están formados por cuatro regiones conservadas intercaladas con cuatro regiones altamente variables, conocidas como RHVm («regiones hipervariables de los minicírculos»).

Los maxicírculos contienen la información necesaria para la síntesis de ARNr y de enzimas de la respiración celular. Sin embargo, esta información puede estar incompleta, requiriendo de una posterior edición en sus transcritos para dar lugar a ARNm maduros. En este punto es de especial interés la función de las RHVm, las cuales codifican para unos pequeños ARN, conocidos como ARN guías (ARNg), encargados de la edición que implica la inserción o delección de residuos de uridina.

La composición de minicírculos, y por ende de RHVm, presenta una gran variabilidad entre diferentes linajes e incluso entre diferentes cepas de un mismo linaje. Esto es debido a cierta aleatoriedad en la segregación de minicírculos cada vez que el kinetoplasto se divide (generando un efecto similar al de la deriva genética). Se ha observado incluso que algunos ARNm pueden ser editados por diferentes ARNg en una misma región (redundancia) o que algunas cepas han perdido RHVm que le permitan editar algunos de sus mensajeros. Con base en esto se ha propuesto que algunos ARNm pudieran no ser necesarios en todas las etapas del ciclo de vida del parásito. En este sentido, el ligamiento de RHVm (que editan diferentes ARNm) podría evitar la pérdida (por deriva de los minicírculos) de los ARNg que no son necesarios en ciertas fases del ciclo de vida.

El objetivo de este trabajo fue analizar mediante simulación por computadora la dinámica evolutiva de los minicírculos de *T. cruzi*. Para ello se emplearon modelos computacionales programados en C++. Se evaluaron diversos factores que podrían influir en la diversidad de las RHVm y en la viabilidad de las poblaciones de parásitos, y se realizaron 49 pruebas que incluyeron ciclos de vida en un hospedador o una alternancia entre dos hospedadores. Además, se realizaron comparaciones entre modelos que podían o no presentar sus RHVm ligadas en un mismo minicírculo. En las pruebas que consideraron un único hospedador se observó que, el tamaño de la red de minicírculos solo influye en la viabilidad a corto plazo, mientras que a largo plazo no se observaron cambios para las diferentes pruebas. Por otro lado, la mayor diversidad de RHVm y viabilidad poblacional fue observada en los modelos que incluyeron ligamiento de las RHVm en un minicírculo. Por el contrario, tanto el aumento en el número de sitios que requieren edición en los ARNm como el aumento en la proporción de clases de RHVm que no codifican ARNg significaron una disminución en la viabilidad. Por otra parte, en las pruebas que incluyeron una alternancia entre dos hospedadores, se observó una fuerte caída en la viabilidad poblacional cuanto mayor fue el grado de segregación aleatoria de los minicírculos al dividirse el ADNk, y el ligamiento de RHVm representó ventajas en un rango estrecho de configuraciones de parámetros sugiriendo que no es suficiente para evitar la pérdida de ARNg temporalmente no esenciales.

Tabla de contenido

Agradecimientos	2
Resumen	3
1. Introducción	5
2. Objetivos e hipótesis	9
3. Materiales y Métodos	10
4. Resultados	18
5. Discusión	28
6. Conclusiones	31
7. Referencias bibliográficas	32
8. Anexo	35

1. Introducción

Los kinetoplastidos son un grupo de eucariotas unicelulares que se caracterizan por la presencia de una única mitocondria, la cual ha sido muy estudiada por sus características peculiares. Este grupo es de gran importancia tanto médica como ecológica, ya que incluye a varios organismos patógenos, tales como *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* spp. (Lukes, Hashimi & Zikova, 2005; Tomasini, 2018). Estos organismos, pertenecientes a la Familia Trypanosomatidae, son de especial interés por ser agentes etiológicos de importantes enfermedades para humanos y animales de interés económico (Jansen, Xavier & Roque, 2020; CABI, 2021). El parásito *T. cruzi*, es el agente causal de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, potencialmente mortal y considerada desatendida (Rev, Kobylinski & Connelly, 2006). Esta enfermedad es endémica en Latinoamérica, aunque debido a la globalización y el aumento de viajes internacionales se han reportado casos en Europa y Asia, y constituye un importante problema de salud pública en determinadas áreas de Argentina (Ragone et al., 2015; de Oliveira et al., 2020). *T. cruzi* muestra una remarcable heterogeneidad genética, por ello ha sido clasificada en seis principales Unidades Discretas de Tipificación (UDT) designadas como TcI-TcVI (Zingales et al., 2012) y un séptimo linaje, TcBat, asociado en principio con murciélagos, aunque se han informado infecciones humanas por esta UDT (Jansen, Xavier & Roque, 2020).

La mitocondria de los tripanosomátidos presenta su ADN, conocido como ADN kinetoplastídico (ADNk), con una organización estructural particular. Posee dos tipos de moléculas circulares concatenadas formando complejas redes, que pueden variar su tamaño dependiendo del género o especie. Además posee un particular sistema de edición por inserción/delección de uridina de sus transcritos mitocondriales (Lukes, Hashimi & Zikova, 2005). *T. cruzi* presenta una red de ADNk que contiene entre 20-50 maxicírculos (≈ 36 kb) y entre 20.000-30.000 minicírculos (≈ 1.42 kb) (Sturm et al., 1989; Telleria et al., 2006; Callejas-Hernández et al., 2021). Los maxicírculos son funcionalmente análogos a otros ADN mitocondriales eucariotas, llevan información para síntesis tanto de ARNr como de enzimas de la respiración celular (Simpson, 1997). Los minicírculos están formados por cuatro regiones conservadas (≈ 120 pb) que se ubican a 90° una de otra y se intercalan con igual número de regiones altamente variables (≈ 330 pb), denominadas RHVm (Regiones Hiper Variables de los minicírculos) (Fig. 1) (Rusman et al., 2019; Callejas-Hernández et al., 2021). Estas últimas codifican para ARN guías (ARNg) involucrados en la edición de ARNm codificados por los maxicírculos (Fig. 1) (Simpson, Sbicego & Aphasizhev, 2003; Callejas-Hernández, 2021).

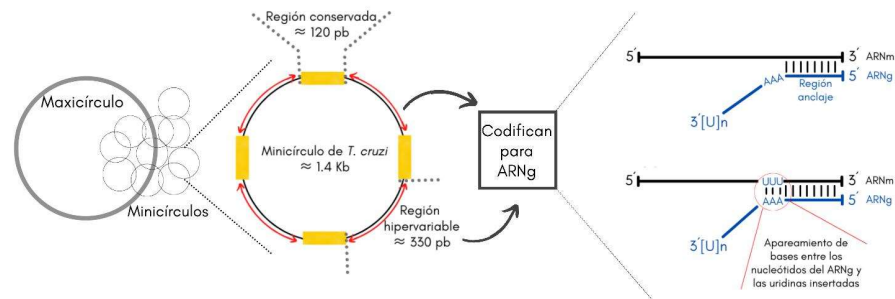


Figura 1. Representación esquemática de la red de ADNk, de la estructura de un minicírculo y del sistema de edición de un ARNm por inserción de residuos de uridina de *Trypanosoma cruzi*. A la izquierda se ilustra la red de ADN kinetoplastídico. La línea gruesa representa un maxicírculo y las líneas delgadas representan a los minicírculos. En el centro se muestra la estructura característica de un minicírculo, con cuatro regiones conservadas (rectángulos en amarillo) y cuatro regiones hipervariables (flechas en rojo) intercaladas con las primeras. Las regiones hipervariables de los minicírculos son las encargadas de codificar para los ARN guías necesarios para la edición de los ARNm mitocondriales. A la derecha se esquematiza el sistema de edición. Las líneas negras representan la molécula de ARNm y las líneas azules representan su correspondiente ARNg. Las líneas verticales indican el apareamiento de bases. Arriba se observa la región de anclaje del ARNg que reconoce y se aparea con una región del ARNm. Abajo se observa la porción central del ARNg que contiene la información para la edición y es complementaria a la secuencia editada del ARNm maduro.

Desde su descubrimiento, en 1990, las RHVm han mostrado una gran heterogeneidad tanto en clases de secuencias, que codifican para diferentes ARNg, como en la abundancia de cada una de ellas. Más adelante, con estudios de secuenciación, se observó la existencia de ARNg con distintas secuencias pero capaces de unirse y editar la misma región de un transcripto. Esto es posible debido a la capacidad de formar apareamientos de bases G:U (no canónicos), además de los apareamientos Watson-Crick (canónicos), dando como resultado ARNm maduros idénticos. Estas clases de secuencias de RHVm fueron consideradas redundantes (Simpson, 1997; Savill & Higgs, 2000).

Trypanosoma cruzi atraviesa un ciclo de vida complejo que alterna entre insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, que actúan como vectores, y huéspedes vertebrados (Tyler, Olson & Engman, 2003; Hernández et al., 2012). Este parásito posee diferentes etapas biológicas que se diferencian morfológicamente (Kollien & Schaub, 2000). Por un lado, los epimastigotes no infecciosos, y de replicación extracelular, se encuentran en el intestino medio de los triatominos donde pueden diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos no replicativos. Estos últimos representan la etapa infecciosa en la transmisión mediada por el vector y por lo tanto son quienes propagan principalmente la enfermedad de Chagas en zonas endémicas (Hernández et al., 2012). Luego de la infección de las células en el huésped vertebrado se diferencian en los estadios de amastigotes de replicación intracelular y posteriormente en tripomastigotes infecciosos que llegan al torrente sanguíneo y son ingeridos por los insectos hematófagos. Una vez en el vector pueden diferenciarse a epimastigotes para reiniciar el ciclo (Fig. 2) (Callejas-Hernández, 2021).

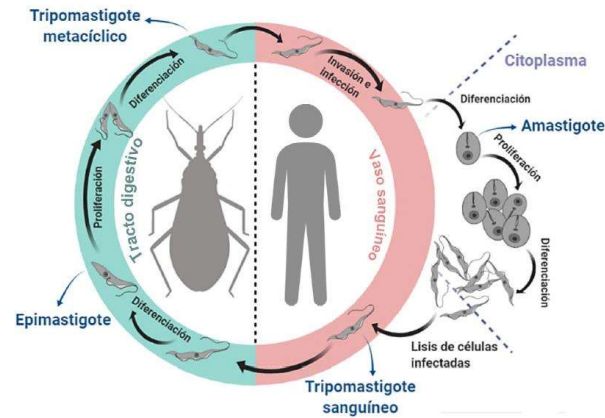


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. En el esquema se ilustra el ciclo de vida de *T. cruzi*, que incluye su estadio en el insecto triatómino y en los mamíferos. A lo largo del mismo se detallan las diferentes formas biológicas de este patógeno: epimastigote, tripomastigote metacíclico (triatómino), amastigote y tripomastigote sanguíneo (mamífero). Tomado de [Dinatale et al. \(2021\)](#).

En la naturaleza, los vectores pueden estar infectados por una o más cepas de *T. cruzi* pertenecientes a diferentes genotipos ([Kollien & Schaub, 2000](#)). Curiosamente, diversos autores han reportado eventos de intercambio genético en poblaciones naturales de varias especies de kinetoplástitos y existe evidencia de que *T. cruzi* puede presentar grupos verdaderamente sexuales coexistiendo con otros altamente clonales ([Schwabl et al., 2019](#)). En esta especie está claro que existen híbridos, aunque el mecanismo y la frecuencia de intercambio genético son aún debatidos ([Ramírez & Llewellyn, 2014](#)). Algunos autores defienden el modelo de evolución clonal predominante, considerando a la reproducción sexual como casos raros o ausentes en poblaciones naturales de protozoos parásitos y, por lo tanto, insuficiente para romper el patrón principal de la estructura clonal de una población ([Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990](#); [Tibayrenc & Ayala, 2018, 2020](#)). Por otra parte, otros autores, aunque reconocen la importancia de la propagación clonal, proponen que la reproducción sexual es fundamental para la aptitud del organismo en múltiples escalas evolutivas y ocurre con más frecuencia de lo que se sospechaba anteriormente ([Ramírez & Llewellyn, 2014](#)). [Rusman et al. \(2020\)](#) mostraron que una cepa híbrida TcI tenía un patrón heterocigota y contenido de ADN compatibles con meiosis y fusión de gametas. Sin duda los reportes de grupos panmícticos en esta especie han significado un aporte importante en la discusión de la diversidad genética de *T. cruzi*. Además, tales hallazgos permiten explicar en gran medida la extrema diversidad existente, así como su extrema adaptabilidad a las especies y tejidos de sus numerosos huéspedes vertebrados e invertebrados ([Jansen, Xavier & Roque, 2020](#)).

En los últimos años, la secuenciación masiva de amplicones permitió dilucidar la diversidad de las secuencias de RHVm a nivel intra- e inter-UDT de *T. cruzi*. Con más de 14 millones de secuencias de RHVm obtenidas de los 6 principales linajes, se las clasificó en grupos que compartían un porcentaje de identidad de su secuencia. Se observó que los grupos de RHVm fueron compartidos entre cepas mayormente a nivel intra-UDT, con muy pocos o ningún grupo compartido entre cepas de diferentes UDT ([Rusman et al., 2019](#)). Se observó mayor diversidad de grupos de RHVm (índice de Simpson) para los linajes TcI, TcII y TcIII, sin la presencia de grupos de RHVm dominantes. Además, se observaron fuertes

variaciones a nivel intra-UDT con respecto al número de grupos de RHVm en cada una de las cepas. Esto se manifestó de forma evidente en el linaje TcII, con la cepa Esmeraldo doblando el número de grupos presentes en la cepa Tu18cl93. Por otro lado, los linajes TcIV, TcV y TcVI mostraron unos pocos grupos de RHVm dominantes, y el resto de los grupos con una baja proporción de lecturas de secuenciación ([Rusman et al., 2019](#)). Las cepas pertenecientes a TcV mostraron una mayor proporción de grupos compartidos pero fuertes diferencias en el número de secuencias de los mismos. Por su parte, las cepas TcI, más distantes genéticamente, mostraron además de fuertes divergencias en el número de secuencias de los grupos, una gran cantidad de grupos no compartidos. De esto se deduce que las frecuencias de los grupos de RHVm pueden variar de manera estocástica, conduciendo así a una divergencia tanto entre cepas (de un mismo UDT) como entre diferentes UDT. Esto implicaría que la frecuencia de las clases de RHVm no está bajo presión selectiva, ya que la edición efectiva de los ARNm no depende de la abundancia de un minicírculo ([Rusman et al., 2019](#)). De esta forma, algunas clases de RHVm podrían perderse si tal pérdida no resulta deletérea, y llevar a una divergencia por cambios en la frecuencia de clases de RHVm más rápido que por cambios en sus secuencias ([Rusman et al., 2019](#)). Dichas variaciones en la frecuencia de las clases de RHVm han sido también inferidas por [Savill & Higgs](#) (1999) para *T. brucei* y *Leishmania* en un estudio de simulación por computadora probando la hipótesis de segregación aleatoria. Su modelo predice, entre otras cosas, cambios a gran escala en el número de copias de clases, una presión selectiva hacia tamaños de red más grandes, una ventaja adaptativa de la segregación no aleatoria de los minicírculos sobre la segregación completamente aleatoria, y el uso de la reproducción sexual (particularmente fusión de kinetoplastos) en *T. brucei* para mantener su viabilidad. Además, predice que los ARNm redundantes no deberían persistir en las especies que tienen un ARNm por minicírculo y explica la pérdida de clases no esenciales. Esto podría justificar la pérdida de edición observada en la cepa UC de *L. tarentolae* por pérdida de minicírculos, como resultado quizá de la falta de requerimiento de los productos proteicos durante la etapa en cultivo ([Simpson, 1997](#)). Asimismo, estos datos podrían insinuar una ventaja para *T. cruzi*, que presenta cuatro RHVm por minicírculo. Así se podría evitar la pérdida de clases que no son requeridas durante algún estadio del parásito. Por ejemplo, [Ramírez-Barrios et al.](#) (2020) observaron que los epimastigotes privados de la capacidad de editar correctamente algunos ARNm podían crecer a tasas normales, pero al recibir un estímulo (como la inanición) para su transición a tripomastigote no fueron capaces de diferenciarse ([Shaw, Kalem & Zimmer, 2016](#)). También [Carranza et al.](#) (2009) trabajando con epimastigotes mutantes de *T. cruzi* con deleciones en genes que codifican subunidades del complejo I de la cadena respiratoria, presentaron evidencia de que este complejo tiene una función limitada y que las mutaciones no afectan la respiración mitocondrial. Estos datos, más la evidencia de vías alternativas para la oxidación de NADH sugieren que el complejo I no tiene (o tiene una funcionalidad limitada) en este proceso. Esta conclusión es válida para epimastigotes en un medio rico en glucosa, donde la producción de ATP se obtendría principalmente por fosforilación a nivel de sustrato. Sin embargo, para los estadios que dependen del catabolismo de aminoácidos (como amastigotes intracelulares), la fosforilación oxidativa se vuelve esencial.

La aplicación de modelado computacional puede ser muy útil para identificar los procesos evolutivos que determinan las diferencias observadas entre las cepas. Por ejemplo, el modelado puede ser eficaz para entender si el ligamiento de clases de las RHVm en un mismo minicírculo podría estar relacionado con la existencia de genes que no son requeridos en alguna etapa del ciclo de vida del parásito ([Speijer, 2006](#); [Buhrman et al., 2018](#)). Esto podría examinarse comparando la viabilidad celular en modelos con una

única RHVm por minicírculo y modelos con más de una RHVm por minicírculo, en parásitos que cursan un ciclo de vida complejo. Además, para discriminar si el ligamiento de RHVm no produce una ventaja adaptativa independientemente del tipo de ciclo de vida, es necesario comparar con modelos en los que los parásitos tienen un único hospedador. Esto resulta también de utilidad para comprender la dinámica de minicírculos en especies de tripanosomátidos con ciclo monoxénico (un único hospedador) ([Schmid-Hempel et al., 2011](#)). Por otra parte, el modelado nos ayudaría a comprender qué factores son los que determinan la gran diversidad de secuencias de las RHVm, la gran divergencia entre las cepas y la redundancia de clases de ARNg observadas en *T. cruzi*. Los análisis de la diversidad de las RHVm, así como su dinámica evolutiva son de gran importancia para evaluar las relaciones y la estructura genética de las poblaciones de *T. cruzi* y así comprender su patogénesis.

2. Objetivos e hipótesis

2.1. Objetivo general

- Estudiar mediante simulación computacional la dinámica evolutiva de las poblaciones de minicírculos, en *Trypanosoma cruzi* en particular, y en los tripanosomátidos en general, para comprender cómo es afectada la diversidad de minicírculos y cómo afecta a la viabilidad del parásito y de las poblaciones del mismo.

2.2. Objetivos específicos

- Analizar mediante simulaciones en computadora, y en el escenario de un ciclo de vida en un único hospedador, cómo la diversidad de RHVm y la viabilidad del parásito son afectadas por:
 - o Distintos tamaños de la red de minicírculos,
 - o El ligamiento de dos o más RHVm en un minicírculo,
 - o Un mayor o menor número de sitios en ARNm que requieren edición en un parásito,
 - o Una mayor o menor proporción de RHVm que no codifican ARNg.
- Evaluar el efecto que el ligamiento de cuatro RHVm por minicírculo tiene en la viabilidad de los parásitos y en la diversidad de RHVm en modelos que consideran un ciclo de vida alternando entre diferentes hospedadores.

2.3. Hipótesis de trabajo

- El ligamiento de las RHVm permite una redundancia de clases y evita la pérdida de clases no codificantes de ARNg y de aquellas que son sólo requeridas en algunas etapas del parásito, manteniendo la diversidad, sobre todo en ciclos de vida complejos.
- Un aumento en el número de sitios de edición disminuye la viabilidad de la población debido a un mayor requerimiento de diversidad de clases de RHVm y su consecuente pérdida por deriva de los minicírculos.
- Un mayor tamaño de la red de minicírculos representa una ventaja ya que permite mantener una mayor diversidad de clases de RHVm, lo que incide en la viabilidad.
- Una alta proporción de RHVm no codificantes es deletéreo debido a que, al estar mayormente representadas en la red, reduce el ligamiento entre clases esenciales, llevando a una pérdida de diversidad y en consecuencia disminuye la viabilidad de la población.

3. Materiales y Métodos

3.1. Modelado

La investigación se llevó a cabo mediante el desarrollo de modelos computacionales basados en agentes (MBA) que permiten modelar la estructura de un sistema complejo y simular su evolución dinámica a lo largo del tiempo ([Rodríguez Zoya & Roggero, 2015](#)). Esta técnica se basa en modelar los sistemas desde el punto de vista de los elementos que los componen; los agentes, y las relaciones entre ellos. Un agente se define como un elemento individual e identificable, que posee un conjunto de características o atributos, y reglas que rigen su comportamiento. Este agente interactúa con otros agentes y con el entorno en el que se sitúa ([Pereda & Zamarreño, 2015](#)).

El MBA permite realizar las simulaciones necesarias para probar diversas hipótesis, examinar el comportamiento de sistemas biológicos complejos, realizar experimentos de manera acelerada o incluso como una herramienta de apoyo para aportar más conocimiento. Además, los resultados pueden ser validados comparándolos con un conjunto de resultados obtenidos en pruebas experimentales/de laboratorio ([Rosñol et al., 2013](#)).

Estos modelos fueron programados usando el lenguaje C++. El código fuente está disponible en el [Anexo](#). Los elementos del modelo se detallan a continuación.

3.1.1. Agentes

Los agentes son los actores que representan el sistema. En este tipo de modelado se puede dividir a los agentes por clases. Los agentes de una misma clase se rigen por las mismas reglas, pero se comportan de manera independiente. Así, un mayor número de agentes aumenta el nivel de complejidad de la simulación, la cual se basa en el comportamiento de las estructuras más pequeñas pero muestran el comportamiento global ([Rosñol et al., 2013](#)).

Con el fin de comprender cómo evoluciona la diversidad de RHVm y la viabilidad en las poblaciones, el modelo desarrollado incluye dos tipos de agentes anidados: los parásitos y los minicírculos. Los parásitos son elementos constituyentes de una población que evoluciona bajo reglas que dirigen la dinámica poblacional a lo largo de las generaciones.

Cada parásito posee un conjunto de intervalos de ARNm mitocondriales que requieren edición por ARNg, tal que un intervalo de ARNm puede ser editado por diferentes ARNg (redundancia), pero un ARNg puede editar solo uno de estos fragmentos de ARNm mitocondriales. Para simplificar la nomenclatura, estos intervalos de ARNm serán denominados como SiRE de aquí en adelante (por **S**itios que **R**equieren **E**dición). Los SiRE pueden ser clasificados de acuerdo al ARNm al que pertenecen. De esta manera, un SiRE será de tipo I si el ARNm al que pertenece es requerido a lo largo de todo el ciclo de vida. Alternativamente, algunos de los modelos descritos más abajo consideran también la existencia de ARNm mitocondriales que son esenciales solo en ciertas etapas del ciclo de vida del parásito, por lo que sus SiRE se clasifican como tipo II.

Por otro lado, cada parásito posee un conjunto de m minicírculos, cada uno en un número particular de copias. Cada minicírculo contiene una o más regiones hipervariables de minicírculos (RHVm). Además, cada RHVm codifica o no un ARNg. El conjunto de minicírculos con sus copias simulan la red de minicírculos en el ADNk de un parásito. Las RHVm se clasificaron de acuerdo a si producen o no un ARNg y el tipo de SiRE sobre el que actúan. De esta manera, se trabaja con tres tipos de RHVm: las de tipo I fueron aquellas que editaban un ARNm esencial durante todo el ciclo de vida del parásito (SiRE tipo I); las

RHVm de tipo II fueron aquellas que editaban un ARNm que solo es requerido en una fase del ciclo vital (SiRE tipo II); y por último, las RHVm de tipo III fueron aquellas que no codifican para ARNg.

3.1.2. Entorno

Se definen dos posibles entornos en los que evolucionan las poblaciones de parásitos. El primer entorno es simple y se considera que la población evoluciona siempre en un mismo tipo de hospedador/fase en la que todos los SiRE son tipo I (la edición es esencial todo el tiempo). El segundo entorno considera que la población evoluciona alternando entre dos tipos de hospedadores/fases. En una de las fases todos los SiRE deben poseer un ARNg (y por ende una RHVm) que los edite. En la otra fase, no es necesario que los SiRE tipo II tengan una RHVm que los edite y los parásitos pueden sobrevivir en su ausencia mientras dure tal fase. Los parámetros G_e y G_{ne} permiten diferenciar entre un ciclo de vida simple y un ciclo de vida complejo. Estos parámetros indican el número de generaciones en que las clases de RHVm de tipo II son o dejan de ser esenciales, dependiendo del estadio en el que se encuentra el parásito. De esta manera, cuando el parámetro G_{ne} es establecido como 0 se considera que las clases de RHVm de tipo II son siempre esenciales y, por lo tanto, se trata de un ciclo de vida simple. En cambio, cuando este valor es un número mayor a 0 se trabaja con un ciclo de vida complejo, en el cual las clases de RHVm de tipo II pierden esencialidad durante ese lapso de generaciones.

3.1.3. Reglas de la dinámica de los minicírculos dentro de los parásitos

Estas reglas diferencian a cada agente y definen la secuencia de acciones entre un parásito y su descendiente. En primer lugar se establece el tamaño de la red de minicírculos, m , el cual se mantiene constante generación tras generación. La segregación de los minicírculos entre células hijas procede de manera parcialmente aleatoria, lo que permite una variación en las frecuencias de cada clase de RHVm de manera parcial o completamente estocástica. Para ello se define el parámetro P , el cual determina la proporción de minicírculos que no segregan al azar y, en consecuencia, estarán indefectiblemente presentes en el parásito descendiente. Por otra parte, para simplificar el modelo, se utiliza una distribución multinomial para simular la variación en la frecuencia de los minicírculos de un parásito. Así, la frecuencia de aquellos minicírculos que segregan de manera aleatoria será determinada utilizando como parámetros las frecuencias de los minicírculos de la generación actual. Como consecuencia de esto, las clases de minicírculos en un parásito pueden ganarse o perderse con el paso de una generación a otra.

3.1.4. Reglas de la dinámica poblacional

Se especificaron reglas que definen las interrelaciones entre los agentes y el ambiente, controlando así la dinámica de la población. En principio se establece el tamaño poblacional, N , el cual se mantiene constante a lo largo de las generaciones. Para dar paso a una nueva generación, se corrobora que cada uno de los parásitos que componen a la población actual cuenten con al menos una clase de RHVm esencial, es decir, que todos los sitios de edición esenciales en ese momento estén cubiertos. De lo contrario, si alguna clase de RHVm esencial se pierde, el parásito es eliminado de la población por considerarse inviable. Finalmente, a partir de los parásitos que sobreviven en la generación actual, se realiza un muestreo aleatorio con reposición para formar la siguiente generación hasta alcanzar el tamaño poblacional de N individuos.

3.1.5. Inicialización del modelo

Luego de establecer el valor de N , cada parásito de la población es generado de manera aleatoria. Su red de minicírculos, de tamaño m , presenta un número predeterminado de clases de RHVm de tipo I, II y III, que puede variar con las generaciones. A las RHVm tipo I y tipo II se les asigna un SiRE que determina su función durante el ciclo de vida, mientras que las de tipo III no poseen un SiRE asignado ya que no codifican para ARNg. A continuación, las RHVm pueden o no, de acuerdo al valor del parámetro R_m , ligarse al azar formando clases de minicírculos. De esta forma una clase de minicírculo quedará determinada por las RHVm que lo componen. Seguidamente, se establecen las frecuencias de dichas clases de minicírculos en la red de minicírculos, asumiendo una distribución de abundancia inicial uniforme. La frecuencia de cada clase estará determinada por el tamaño de la red, el número de RHVm por minicírculo y el número inicial de clases de RHVm. De este modo obtenemos la Frecuencia Inicial de las Clases de Minicírculos (FICM):

$$FICM: \frac{\text{Tamaño de la red} \times N^{\circ} \text{ de RHVm por minicírculo}}{(N^{\circ} \text{ de clases de RHVm})}$$

3.1.6. Iteraciones y repeticiones.

El número de iteraciones para cada prueba puede ser introducido por el usuario con el parámetro G . Las simulaciones se ejecutaron por veinte mil generaciones, asumiendo que la población no se extinguiría por sí sola como consecuencia de la deriva de minicírculos en este lapso de tiempo, y esperando alcanzar el equilibrio en la diversidad de clases de RHVm.

Además, para cada prueba se realizaron múltiples corridas experimentales (repeticiones) con el fin de estimar la media y la variabilidad de los diferentes parámetros medidos. El número de repeticiones se establece con el parámetro N_r . Con el propósito de obtener resultados reproducibles se usó Mersenne twister, un generador de números pseudo-aleatorios, que permite establecer una semilla para cada cadena de números pseudo-aleatorios. De esta manera, es posible repetir de manera exacta los resultados de la simulación siempre que se use la misma semilla para el generador de números aleatorios. Así, las repeticiones se realizaron con diferentes semillas de números pseudo-aleatorios, determinadas en principio con el parámetro N_s y aumentando en una unidad para cada repetición.

3.1.7. Fundamentación de los parámetros del modelo

El MBA brinda la posibilidad de utilizar datos obtenidos de un laboratorio, en el campo o incluso a partir de la literatura publicada, y fijar las reglas que permitan obtener resultados más realistas de los modelos biológicos complejos ([Rosifol et al., 2013](#)).

Cada modelo se basa en una serie de parámetros que son establecidos al comienzo de cada prueba y que permiten probar las diferentes hipótesis planteadas a partir de su modificación de manera individual en cada caso. El valor de cada parámetro fue establecido en base a evidencia científica, en el caso de que estuviera disponible, o de rangos plausibles para diversas cepas de *T. cruzi*. A continuación se presenta la [Tabla 1](#) que proporciona de manera resumida todos los parámetros, junto a su definición y los rangos de valores utilizados.

Tabla 1. Resumen de los parámetros utilizados en el modelo

Parámetro	Descripción	Rango/Valor
N	Tamaño de la población	200
R_m	Número de RHVm por minicírculo	1-8
m	Tamaño de la red de minicírculos	10.000-80.000
S_t	Número total de sitios que requieren edición	125-500
S_e	Número de sitios de edición esenciales en todas las etapas del parásito	92
r_1	Abundancia inicial de RHVm de tipo I y tipo II por parásito	265-530
r_3	Abundancia inicial de RHVm de tipo III por parásito	130-395
R_1	Abundancia inicial de RHVm de tipo I y II presentes en la población	4000
R_3	Abundancia inicial de RHVm de tipo III presentes en la población	4000
G	Número de generaciones	20.000
G_e	Número de generaciones en que las RHVm de tipo II son esenciales	100
G_{no}	Número de generaciones en que las RHVm de tipo II no son esenciales	12-90
P	Proporción de minicírculos que no segregan al azar, es decir, con segregación determinística	0,99-0,999
N_s	Semilla para inicializar el generador de números pseudoaleatorios a utilizar en cada repetición	1-11
N_r	Cantidad de repeticiones para cada prueba	10

El tamaño de la población, N, fue fijado en 200 para todas las pruebas. Este valor es arbitrario, pero resulta adecuado debido al costo computacional que implican valores mayores. El tamaño de la red de minicírculos fue establecido de manera estándar en 20.000, ya que es el valor aproximado para *T. cruzi*, aunque se evaluaron también otros valores.

Por otra parte, el número de sitios de edición fue calculado de manera aproximada a partir de las secuencias de genes paneditados conocidas para algunas cepas de *T. cruzi*, tales como Esmeraldo, Sylvio y CLB, y bajo algunas suposiciones. Se asume que, si en promedio un ARNg tiene 40 bases, la mitad de ellas reconocen una región en el ARNm y la otra mitad es la encargada de la edición. Así pues, se define un sitio de edición como 20 bases consecutivas. Bajo este razonamiento, si se conoce el número de bases presentes en los ARNm editados se puede estimar el número de sitios de edición dividiendo la longitud del ARNm editado por 20. De esta manera se obtiene el número de sitios de edición para cada ARNm y luego se realiza la sumatoria para obtener el número total de sitios de edición en un parásito. Este valor fue de 250.

Según las hipótesis planteadas, los elementos del complejo I de la cadena respiratoria no son necesarios en todas las etapas del ciclo vital, por lo que, a partir de los datos anteriores, es posible conocer

los sitios de edición no esenciales. Así se obtuvo el número de sitios de edición imprescindibles en todos los estadios del parásito:

$$S_e = S_t - N^{\circ} \text{ de sitios de edición no esenciales (elementos del complejo I)}$$

Para cada prueba también es necesario indicar el número de clases de RHVm de tipo I y II, y el número de clases de RHVm de tipo III por parásito. Para el primer caso se usaron datos obtenidos anteriormente para la cepa Esmeraldo, cuyo valor fue 384 (Rusman et al., 2019). Para calcular el número de clases de RHVm de tipo III se tuvo en cuenta el porcentaje de RHVm no codificantes que ya estaba estimado para dicha cepa (Rusman et al., 2019). Sabiendo que, estas últimas corresponden al 42%, el valor obtenido anteriormente para las clases de RHVm de tipo I y II corresponden, por lo tanto, al 58%.

Por otra parte, también se fija como valor estándar, utilizado en todas las pruebas, el número de clases de RHVm de tipo I, II y III a nivel poblacional. Este valor fue establecido de manera arbitraria en 4.000 de manera que la diversidad inicial sea máxima (o cercana).

El valor del parámetro G_{ne} (número de generaciones en que las RHVm de tipo II no son esenciales) fue calculado teniendo en cuenta el tiempo de replicación de los epimastigotes de *T. cruzi*, y el rango de tiempo estimado que puede pasar en el vector. Con un tiempo de replicación entre 24h y 60h (Engel, Doyle & Dvorak, 1985), dependiendo de la cepa, y entre 1 a 3 meses en el vector (Kollien & Schaub, 2000) se obtuvo el rango de generaciones que podrían pasar en este estadio, estableciendo un mínimo y un máximo:

$$\begin{aligned} \text{Mínimo} &= \frac{720 \text{ horas (90 días)}}{60 \text{ horas}} = 12 \text{ generaciones} \\ \text{Máximo} &= \frac{2160 \text{ horas (30 días)}}{24 \text{ horas (1 día)}} = 90 \text{ generaciones} \end{aligned}$$

Y se consideraron, además, dos valores intermedios equidistantes, 38 y 64.

Si bien el proceso de segregación de los minicírculos no es aún conocido con certeza, muchos autores han propuesto una segregación parcialmente aleatoria, es decir, un nivel intermedio entre una segregación completamente aleatoria y una segregación determinística (Savill & Higgs, 1999; Rusman et al., 2021). El parámetro P permite establecer la proporción de minicírculos que segregan de forma determinística, dejando una porción restante de minicírculos que pueden variar sus frecuencias por deriva. Este valor fue establecido en 0,99 para los ciclos de vida simple, pero en el ciclo de vida complejo se trabajó con cuatro valores equidistantes – 0,99 - 0,993 - 0,996 - 0,999 – que nos permitió evaluar también las ventajas de la segregación no aleatoria (Savill & Higgs, 1999).

3.1.8. Configuraciones alternativas de parámetros

Como se ha mencionado anteriormente, varios autores han observado que los epimastigotes de *T. cruzi*, hallados en el vector invertebrado, son capaces de sobrevivir sin la correcta edición de algunos ARNm mitocondriales. Con este panorama se ha planteado que el ligamiento de las RHVm en un minicírculo podría resultar ventajoso al evitar la pérdida de clases de RHVm no esenciales en epimastigotes. Cabe destacar que la pérdida de éstas impediría el pasaje al siguiente estadio. Esta situación es la que se define como "ciclo de vida complejo", y que determina tres tipos de clases de RHVm. Mientras que, por el contrario, un "ciclo de vida simple" implica suponer que las RHVm pueden simplemente ser esenciales en todos los estadios del parásito (RHVm de tipo I) o no codificantes (RHVm de tipo III).

Para lograr los objetivos del presente estudio, se ha trabajado con ambos modelos, simple y complejo. Por un lado, se realizaron pruebas considerando un ciclo de vida simple con la intención de

evaluar cómo afectan ciertos factores a la diversidad y abundancia de las RHVm y a la viabilidad de la población. Se ha hecho foco en el efecto del ligamiento de las RHVm en el ciclo de vida simple con el fin de comparar con el siguiente objetivo, donde se evalúa el efecto del ligamiento de RHVm en la diversidad de sus clases y en la viabilidad del parásito pero en un ciclo de vida complejo.

De manera estándar se han realizado dos pruebas que se diferenciaron en el ligamiento de las RHVm. Los parámetros estándar se resumen en la [Tabla 2](#).

Tabla 2. Parámetros utilizados de manera estándar

	Sin ligamiento	Con ligamiento
N	200	
R _m	1	4
m	20.000	
P	0,99	
S _t	250	
S _e	92	
r ₁	384	
r ₃	276	
R ₁	4.000	
R ₃	4.000	
G	20.000	
N _r	10	

Ciclo de vida simple

Las siguientes pruebas fueron realizadas modificando los parámetros uno (o excepcionalmente dos) por vez, para poder demostrar los efectos de cada uno. La [Tabla 3](#) resume las diferentes pruebas realizadas, junto al parámetro que se modificó y el objetivo de su ejecución.

Tabla 3. Pruebas realizadas bajo un ciclo de vida simple, junto a los parámetros modificados en cada una de ellas y su correspondiente valor. Además se resume la finalidad de cada prueba.

Variación en el N° total de RHVm por parásito*			
Parámetro alterado	m		
Valor/es usado/s	10.000	20.000	30.000
Objetivo	Comprobar si un mayor número de RHVm resulta en una ventaja para mantener la diversidad de RHVm del parásito y la viabilidad celular		
Variación en el grado de ligamiento (N° de RHVm por minicirculo)			
Parámetros alterados	R _m	m**	
Valor/es usado/s	1 – 2 – 4- 8	80.000 – 40.000 – 20.000 – 10.000	
Objetivo	Comprobar si el ligamiento de RHVm es <i>per se</i> una ventaja adaptativa		
Variación en el N° total de sitios de edición			

Parámetro alterado	S _t		
Valor/es usado/s	125	250	500
Objetivo	Observar cómo afecta este parámetro a la viabilidad, ya que un mayor número de SiRE requieren más clases de RHVm y la deriva podría disminuir la diversidad de las mismas		
Variación en la proporción de clases de RHVm de tipo 3			
Parámetro alterado	r ₁	r ₃	
Valor/es usado/s	80% = 530	20%=130	
	58% = 384	42%=276	
	40% = 265	60%=395	
Objetivo	Examinar la influencia de la frecuencia inicial de RHVm de tipo III sobre las de tipo I y II, y cómo esto afecta la viabilidad y diversidad de RHVm		

**Estas pruebas también se ejecutaron por 40.000 generaciones*

***Para poder evaluar solo el efecto del ligamiento, se mantuvieron constantes el número de RHVm, alterando también el número de minicírculos que forman la red*

****Todas las pruebas fueron realizadas para modelos sin ligamiento y modelos con ligamiento de las RHVm*

Ciclo de vida complejo

Para el ciclo de vida complejo se han realizado todas las combinaciones posibles entre dos de los parámetros: P y G_{ne}, como se describe en la [Tabla 4](#).

Tabla 4. Parámetros modificados en las pruebas realizadas bajo un ciclo de vida complejo

G _{ne}	P
12 generaciones	0,99 – 0,993 – 0,996 – 0,999
38 generaciones	
64 generaciones	
90 generaciones	

Para evaluar las posibles ventajas del ligamiento en este ciclo, el número de RHVm total por parásito fue el mismo tanto para modelos con ligamiento como para los modelos sin ligamiento. De esta forma, trabajamos con un tamaño de red de 20.000 minicírculos con 4 RHVm cada uno, y una red de 80.000 minicírculos con una única RHVm.

3.1.9. Muestreo y análisis de datos de las simulaciones

Para poder realizar posteriormente los análisis de abundancia y diversidad de RHVm, y de viabilidad celular, se obtuvieron los siguientes datos cada 500 generaciones y para cada repetición:

1. La abundancia para cada clase de RHVm de tipo I, II y III en cada uno de diez parásitos muestreados al azar;
2. El número total de clases de RHVm de tipo I, II y III;

3. Frecuencia acumulada de parásitos muertos a causa de falta de edición en algún sitio de edición esencial y, en caso de extinción, el número de generaciones ocurridas hasta dicho suceso;

4. Número de parásitos muertos en las últimas 500 generaciones.

El programa escribe para cada prueba una tabla de abundancia de clases de RHVm de tipo I, de tipo II y de tipo III presentes en la muestra de parásitos, cada 500 generaciones y para cada una de las repeticiones. A partir de las mismas se calculó el promedio y desvío estándar entre las repeticiones. En el caso de un ciclo de vida simple, se unieron las tablas de abundancia de RHVm de tipo I con las RHVm de tipo II, ya que este ciclo solo considera RHVm esenciales, por un lado, y no codificantes, por el otro.

Para los análisis de diversidad de Simpson se utilizaron las tablas que identifican a cada una de las RHVm en la muestra de parásitos, generadas cada 500 generaciones y para cada una de las repeticiones. Las mismas fueron cargadas en la base de datos MySQL. Una vez allí se calculó la diversidad total de las RHVm y la diversidad para cada uno de los tipos de RHVm de manera individual. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de Simpson: } 1 - D = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

donde S representa el número de clases de RHVm, y p_i es la abundancia proporcional de cada una de ellas.

El cálculo de viabilidad se realizó a partir de las tablas del número de parásitos muertos cada 500 generaciones. A partir de esos datos se calculó el promedio y desvío estándar entre las repeticiones. Si se tiene en cuenta que cada generación está formada por 200 parásitos y las tablas arrojan el número de muertos cada 500 generaciones,

$$200 \text{ parásitos} \times 500 \text{ generaciones} = 100.000 \text{ parásitos}$$

es posible calcular el número de parásitos vivos cada 500 generaciones como:

$$N^{\circ} \text{ parásitos vivos} = 100.000 \text{ parásitos} - N^{\circ} \text{ muertos en las últimas 500 generaciones}$$

y se expresa la viabilidad de la siguiente manera:

$$\text{Viabilidad} = \frac{N^{\circ} \text{ parásitos vivos}}{100.000 \text{ parásitos}}$$

Finalmente, otro dato que se analizó, particularmente en ciclos de vida complejos, fue el número de generaciones hasta la extinción. El programa arroja este dato en las tablas que informan el número de muertos acumulado cada 500 generaciones y, a partir de las mismas, se obtuvo el promedio y desvío estándar entre las repeticiones.

4. Resultados

En total se realizaron 49 pruebas de simulación con sus correspondientes repeticiones. De estas pruebas, 17 corresponden al análisis del efecto de variaciones de distintos parámetros (que definen la dinámica de los micicrulos) en la viabilidad de los parásitos y la diversidad de RHVm. Estas pruebas se llevaron a cabo considerando ciclos de vida en un único hospedador (ciclo de vida simple). Otras 32 pruebas corresponden al análisis del efecto del ligamiento de RHVm en ciclos de vida complejos. A continuación, se detallan los resultados obtenidos.

4.1. Ciclo de vida en un único hospedador

4.1.1. El tamaño de la red de micicrulos influye en la viabilidad de la población sólo en el corto plazo

En las primeras cinco mil generaciones las poblaciones disminuyen su viabilidad y se observa una pequeña ventaja en los casos que presentan un mayor número de RHVm, es decir, mayores tamaños en la red de micicrulos. No obstante, con el paso de las siguientes generaciones, las poblaciones que se ven favorecidas en cuanto a la viabilidad son solo aquellas que presentan ligamiento de sus RHVm, sin influencia del tamaño de la red de micicrulos (Figura 3).

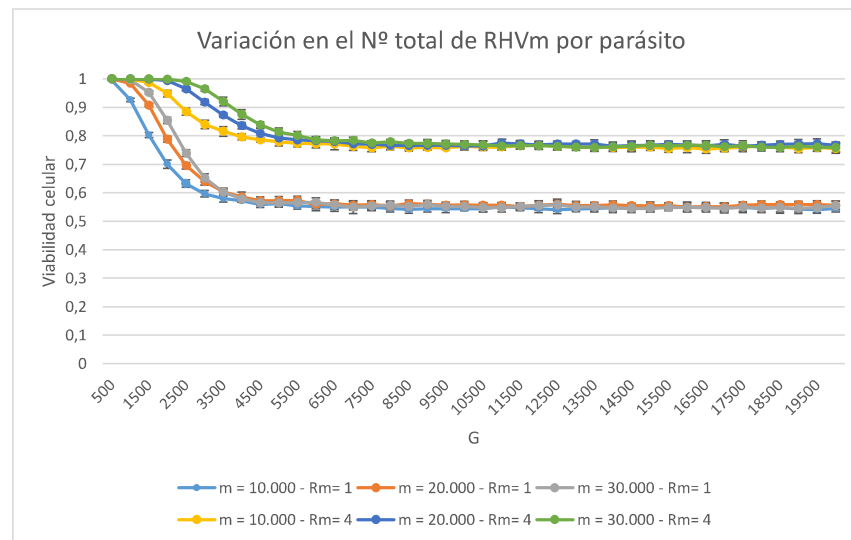


Figura 3. Pruebas con diferente tamaño en la red de micicrulos (m), en modelos con una y con cuatro regiones hipervariables por micicrulos (R_m). En el eje de las abscisas se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas, y en el eje Y se indica la viabilidad celular obtenida a partir del promedio del número de muertos de las 10 repeticiones, cada 500 generaciones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

4.1.2. El ligamiento de RHVm favorece la viabilidad celular y diversidad de clases

Las pruebas con un mayor número de RHVm por micicrulo mostraron una ventaja respecto al mantenimiento de la diversidad de clases de RHVm (Figura 4). Así, el modelo con menor tamaño de la red de micicrulos pero mayor grado de ligamiento fue el más favorecido.

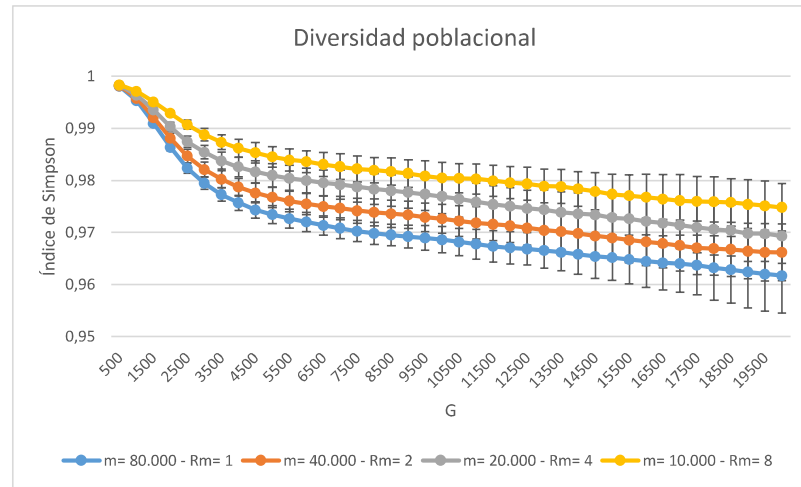


Figura 4. Diversidad de clases de RHVm en pruebas con variación en el tamaño de la red de micirculos (m) y un número total de RHVm que se mantuvo constante por parásito. Para cumplir ambas condiciones fue necesario variar el número de RHVm por micirculo (R_m). En el eje horizontal se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje vertical se representa el índice de diversidad de Simpson a nivel poblacional, es decir, a partir de la muestra de diez parásitos y como un promedio entre las diez repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

Además, la [Figura 5](#) muestra mayor viabilidad celular a medida que aumenta el grado de ligamiento, es decir, el número de RHVm por micirculo.

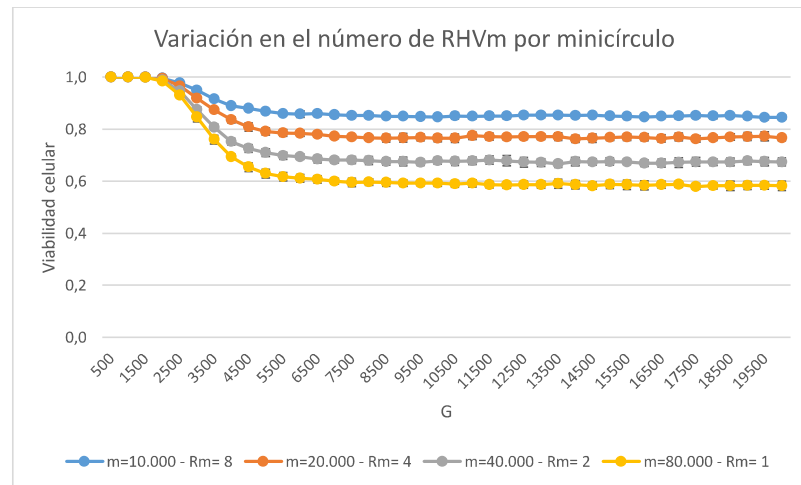


Figura 5. Viabilidad celular en pruebas con variación en el tamaño de la red de micirculos (m) y número total de RHVm constante por parásito. Para ello fue necesario variar el número de RHVm por micirculo (R_m). En el eje X se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje Y se representa la viabilidad celular obtenida a partir del promedio del número de muertos cada 500 generaciones entre las 10 repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

4.1.3. El número de sitios que requieren edición se asocia de forma inversa a la viabilidad celular

La viabilidad celular disminuye a medida que aumenta el número de SiRE, tanto para modelos con ligamiento como para modelos sin ligamiento. Como se observa en la [Figura 6](#) la mayor viabilidad se observó en el modelo con el número más bajo de SiRE y con ligamiento de las RHVm en un minicírculo.

Mientras que, por el contrario, la menor viabilidad a lo largo de las generaciones se encontró en el modelo con mayor número de SiRE y sin ligamiento de las RHVm.

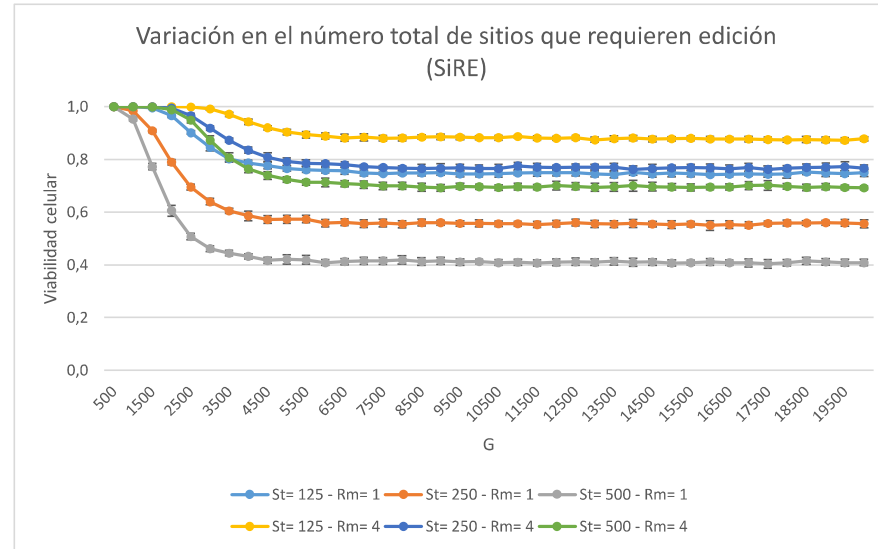


Figura 6. Viabilidad celular en pruebas con modificación en el número total de SiRE (S_t), para modelos con y sin ligamiento de las RHVm (R_m). En el eje de las abscisas se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje de las ordenadas se representa la viabilidad celular obtenida a partir del promedio del número de muertos cada 500 generaciones entre las diez repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

En cuanto a la diversidad de RHVm para las pruebas con distinto número de SiRE por parásito, la comparación de los índices de Simpson por el test de rangos de Wilcoxon entre 125 SiRE y 500 SiRE tanto para modelos con o sin ligamiento de las RHVm ($R_m=1$ y $R_m=4$) no fue significativa en ningún caso ($p=0,45$ en ambas pruebas) a las 20.000 generaciones ([Figura 7](#)).

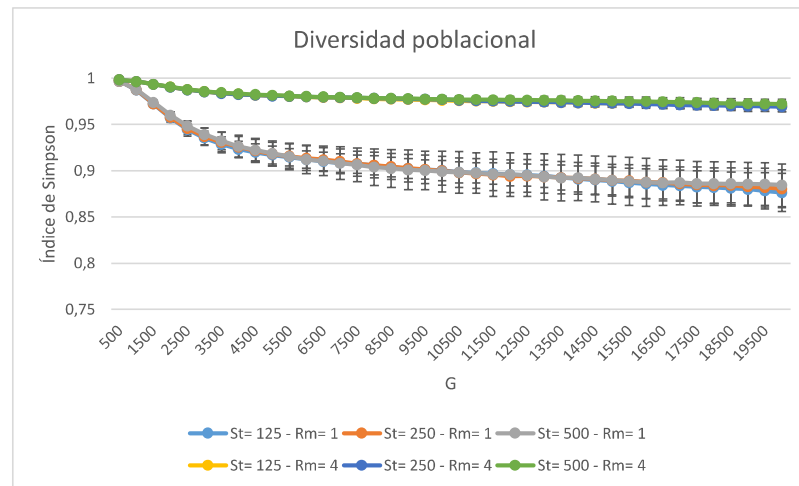


Figura 7. Diversidad de clases de RHVm en pruebas con variación en el número total de SiRE (S_i), en modelos con una y con cuatro RHVm por minicirculo (R_m). En el eje de las X se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje de las Y se representa el índice de diversidad de Simpson a nivel poblacional, es decir, a partir de la muestra de diez parásitos y como un promedio entre las diez repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

4.1.4. Un aumento en la proporción de RHVm de tipo III causa una menor viabilidad y diversidad de RHVm tipo I

Los gráficos de diversidad de las clases de RHVm de tipo I y de tipo III mostraron una relación inversa. Así, cuanto mayor es la proporción inicial de RHVm de tipo III menor fue la diversidad de las RHVm de tipo I. Por el contrario, cuando la proporción inicial de RHVm de tipo III es baja, las RHVm de tipo I mantienen su diversidad más elevada (Figura 8 y Figura 9).

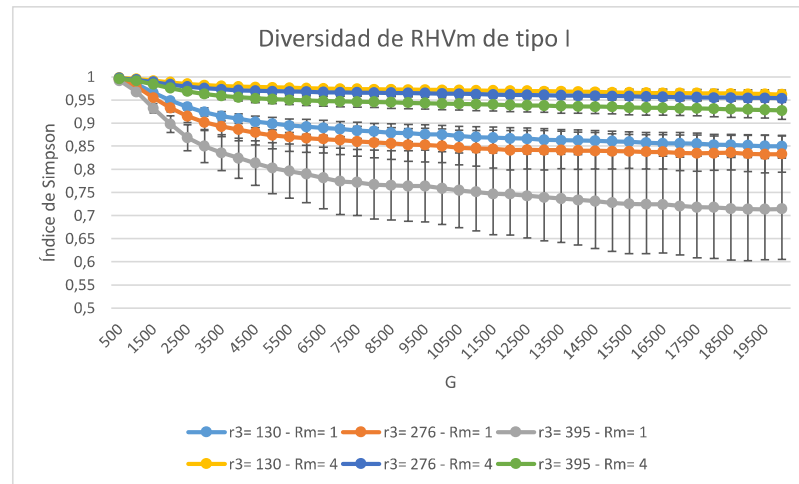


Figura 8. Diversidad de las clases de RHVm de tipo I en pruebas que varían la proporción inicial de RHVm de tipo III (r_3), con una y con cuatro regiones hipervariables por minicirculo (R_m). En el eje X se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje Y se representa el índice de diversidad de Simpson obtenido para las RHVm de tipo I a nivel poblacional, es decir, a partir de la muestra de diez parásitos y como un promedio entre las diez repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

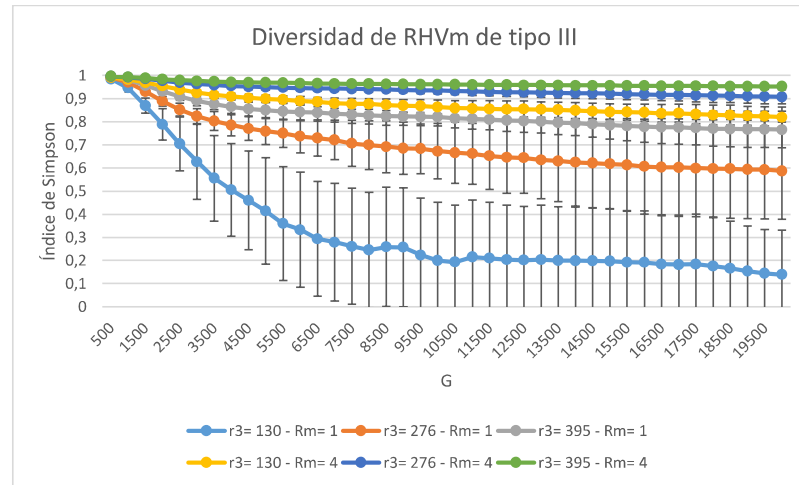


Figura 9. Diversidad de las clases de RHVm de tipo III en pruebas que varían la proporción inicial las mismas (r_3), con una y con cuatro regiones hipervariables por minicirculo (R_m). En el eje X se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje Y se representa el índice de diversidad de Simpson obtenido para las RHVm de tipo III a nivel poblacional, es decir, a partir de la muestra de diez parásitos y como un promedio entre las diez repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

La viabilidad fue menor en los modelos que no presentan ligamiento de sus RHVm. Además, en los modelos con ligamiento de las RHVm se observó una mayor viabilidad cuanto menor era la proporción inicial de RHVm de tipo III (Figura 10).

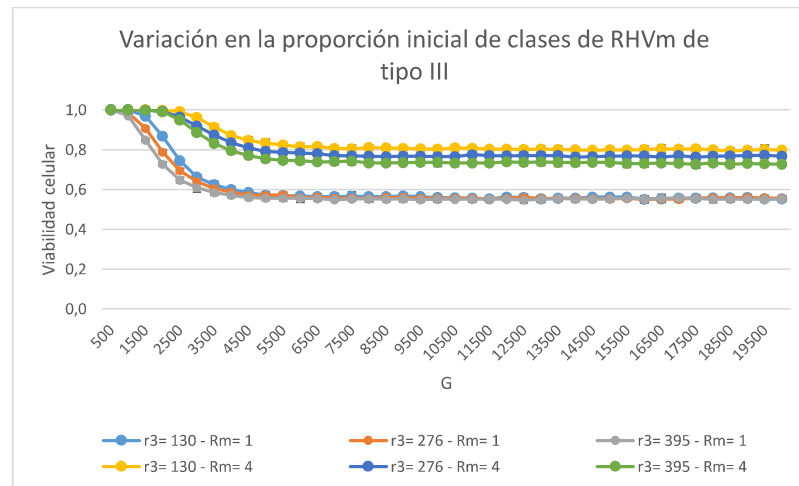


Figura 10. Viabilidad celular en pruebas con diferente proporción inicial de clases de RHVm de tipo III (r_3), en modelos con y sin ligamiento (R_m). En el eje de las abscisas se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje de las ordenadas se representa la viabilidad celular obtenida a partir del promedio del número de muertos cada 500 generaciones entre las diez repeticiones realizadas para cada prueba. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

4.1.5. La redundancia de clases de RHVm y las clases no codificantes disminuyen drásticamente en modelos sin ligamiento

Los gráficos de abundancia de clases de RHVm de tipo I mostraron que en los modelos que no presentan ligamiento, con el paso de las generaciones, se pierde la redundancia de clases de RHVm, manteniéndose un número cercano al número de SiRE. Mientras que, en las pruebas con ligamiento de RHVm, aunque disminuye el número de clases respecto al número inicial, se siguen observando clases redundantes, siendo el número de clases superior al número de SiRE (Figura 11).

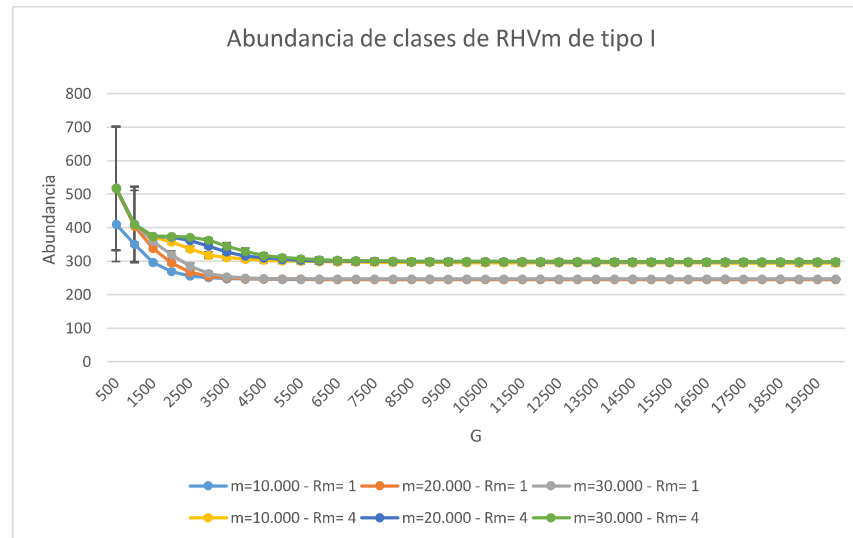


Figura 11. Abundancia de clases de RHVm de tipo I en pruebas que variaban el tamaño de la red de micirculos (m), para modelos con una y con cuatro RHVm por micirculo (R_m). En el eje horizontal se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje vertical se representa la abundancia de clases de RHVm de tipo I, obtenida como un promedio de la abundancia entre las diez repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

En la Figura 12 se observa, en todos los casos, una disminución de clases de RHVm de tipo III. Sin embargo, el gráfico muestra una clara diferencia entre los modelos sin ligamiento y los modelos con ligamiento de las RHVm. En el primer caso, las RHVm están cerca de desaparecer, con valores entre 1-5. Por otro lado, en los modelos que presentan cuatro RHVm por micirculo se mantienen valores elevados de RHVm de tipo III, alrededor de 165 clases, lo que corresponde a un 35% del total de clases de RHVm. Así, estos últimos solo han disminuido en 20.000 generaciones un 7% de sus clases de RHVm de tipo III respecto del 42% que representaban inicialmente.

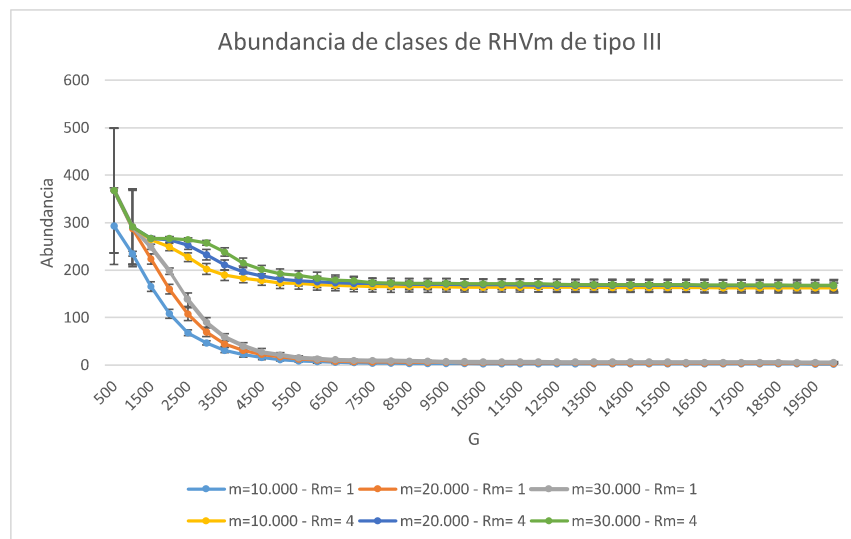


Figura 12. Abundancia de clases de RHVm de tipo III en pruebas que variaban el tamaño de la red de minicírculos (m), para modelos con una y con cuatro RHVm por minicírculo (R_m). En el eje horizontal se representa el número de generaciones (G) por el que fueron ejecutadas las pruebas. En el eje vertical se representa la abundancia de clases de RHVm de tipo III, obtenida como un promedio de la abundancia entre las diez repeticiones. Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

4.2. Ciclo de vida alternando entre hospedadores

4.2.1. Rápida pérdida de viabilidad en modelos con segregación completamente aleatoria

Cuando la segregación es completamente aleatoria, la incorporación de una fase en donde las RHVm no son esenciales (G_{ne}), que representa en *T. cruzi* al estadio epimastigote presente en el hospedador invertebrado, mostró una rápida extinción de la población, independientemente del ligamiento de las RHVm en un minicírculo (Figura 13). Por esta razón, se evaluaron diferentes grados de segregación aleatoria de los minicírculos (Figura 14).

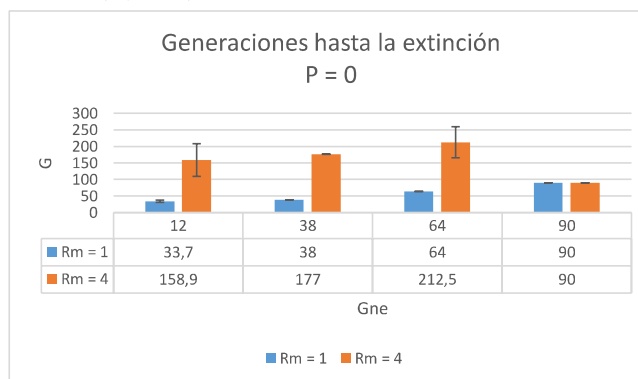


Figura 13. Generaciones hasta la extinción en modelos que incluyen alternancia de hospedadores, y con diferentes grados de segregación aleatoria de los minicírculos (P), tanto para modelos con una como con cuatro RHVm por minicírculo (R_m). El eje vertical indica el número de generaciones (G) en que se extinguieron las poblaciones, obtenido como un promedio a partir de las diez repeticiones. En el eje horizontal se representa el número de generaciones en que las RHVm de tipo II dejan de ser esenciales (G_{ne}). Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

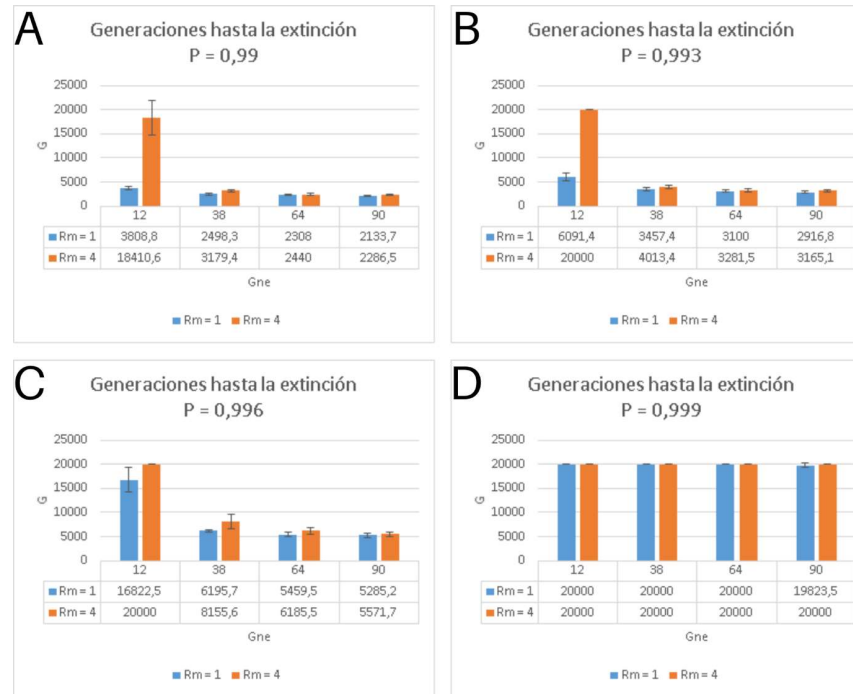


Figura 14. Generaciones hasta la extinción en modelos que incluyen alternancia de hospedadores, y con diferentes grados de segregación aleatoria de los micocírculos (P), tanto para modelos con una como con cuatro RHVm por micocírculo (R_m). El eje vertical indica el número de generaciones (G) en que se extinguieron las poblaciones, obtenido como un promedio a partir de las diez repeticiones. En el eje horizontal se representa el número de generaciones en que las RHVm de tipo II dejan de ser esenciales (G_{ne}). Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

4.2.2. Efecto del ligamiento y la proporción de micocírculos que segregan al azar en la persistencia de las poblaciones

En el ciclo de vida con alternancia entre hospedadores, el ligamiento de las RHVm solo resultó favorable ante una segregación parcialmente aleatoria. Por el contrario, no se observó una ventaja del ligamiento ante una segregación totalmente aleatoria, que condujo rápidamente a la extinción de las poblaciones, ni ante una segregación determinista, donde la viabilidad de las poblaciones fue similar para los modelos con una y con cuatro RHVm por micocírculo (Figura 15).

Además, la comparación entre modelos con una y con cuatro RHVm por micocírculo demostró que el ligamiento brinda una mayor ventaja mientras mayor es la proporción de micocírculos que segregan de manera aleatoria (Figura 15), al menos en un rango de valores de $p \geq 0,99$.

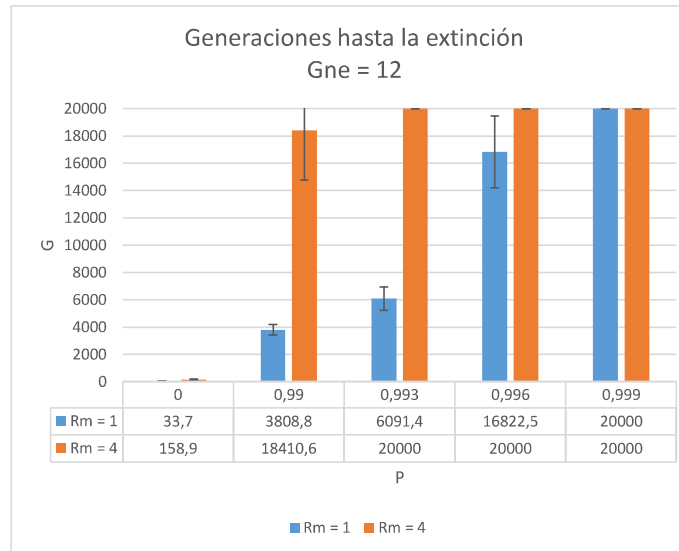


Figura 15. Generaciones hasta la extinción en modelos que incluyen alternancia de hospedadores, donde las RHVm de tipo II dejan de ser esenciales durante un periodo consecutivo de doce generaciones (G_{ne}). El eje vertical indica el número de generaciones (G) en que se extinguieron las poblaciones, obtenido como un promedio a partir de las diez repeticiones. En el eje horizontal se representa la proporción de micirculos que no segregan de manera aleatoria (P), tanto para modelos con una como con cuatro RHVm por micirculo (R_m). Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

4.2.3. La ventaja del ligamiento de RHVm disminuye drásticamente con el incremento del número de generaciones en que las RHVm tipo II dejan de ser esenciales

En los modelos con ciclo de vida en un único hospedador, la comparación de las pruebas ejecutadas con los parámetros estándar con una y con cuatro RHVm por micirculo mostró que las poblaciones no se extinguían en ninguna de las repeticiones al menos hasta la generación 100.000. Mientras que, en los ciclos de vida con alternancia entre hospedadores se observó que, mientras mayor sea el periodo de tiempo en que las RHVm de tipo II dejan de ser esenciales, las poblaciones se extinguen más rápidamente, y el ligamiento de las RHVm no favorece en estos casos, la supervivencia de la población (Figura 16).

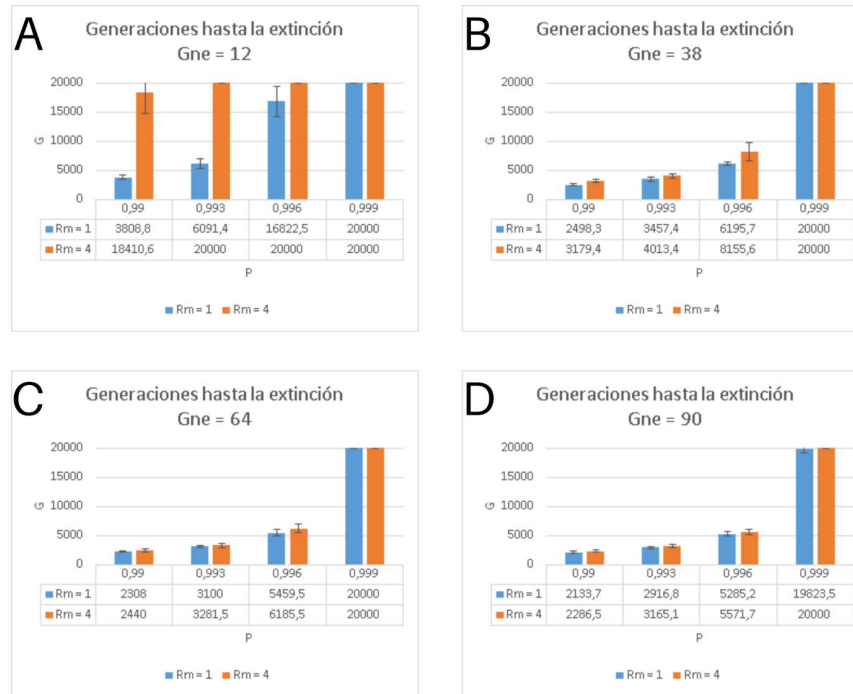


Figura 16. Generaciones hasta la extinción en modelos que incluyen alternancia de hospedadores, con una fase en la que las RHVm de tipo II dejan de ser esenciales (G_{ne}). El eje vertical indica el número de generaciones (G) en que se extinguieron las poblaciones, obtenida como un promedio a partir de las diez repeticiones. En el eje horizontal se representa la proporción de micirculos que no segregan de manera aleatoria (P), tanto para modelos con una como con cuatro RHVm por micirculo (R_m). Las barras de error indican el desvío estándar respecto de la media.

5. Discusión

La enfermedad de Chagas representa un importante problema de salud pública en algunas áreas de Argentina, mostrando una amplia gama de manifestaciones clínicas y epidemiológicas ([Jansen, Xavier y Roque, 2020](#)). Por este motivo resulta de gran importancia comprender la estructura genética poblacional y la dinámica evolutiva del parásito causante de la enfermedad. En este sentido, los minicírculos del ADN kinetoplastídico y sus RHVm han sido intensamente estudiados como marcadores de esta estructura poblacional. Además, su origen y dinámica, única entre los seres vivos, constituyen interrogantes no resueltos sobre la evolución en sí, y particularmente, sobre si representan una ventaja adaptativa para el parásito o un mero callejón evolutivo sin salida ([Flegontov et al., 2011](#); [Lukes et al., 2011](#); [Speijer, 2011](#); [Muñoz-Gómez et al., 2021](#)).

En este trabajo se desarrolló un modelo de población dinámica que permitió analizar la influencia de diversos factores sobre la diversidad de las RHVm y, como consecuencia, sobre la viabilidad de las poblaciones de parásitos. Dichos factores han incluido diferentes tamaños de la red de minicírculos, ligamiento de RHVm en un minicírculo, variación en el número de sitios que requieren edición en un parásito y diferente proporción de RHVm no codificantes de ARNg. Además, el estudio se ha centrado en la comparación de modelos que podían o no presentar ligamiento de las RHVm en un minicírculo, bajo la hipótesis de una posible ventaja evolutiva del ligamiento a los parásitos que presentan un ciclo de vida con alternancia de hospedadores, evitando la pérdida de RHVm que dejan de ser esenciales en alguna fase del ciclo vital ([Speijer, 2011](#); [Brunet & Doolittle, 2018](#); [Buhrman et al., 2018](#)).

Se ha observado en este trabajo que el ligamiento de las RHVm en un minicírculo no resultó ventajoso en los modelos que incluyeron un ciclo de vida con alternancia entre hospedadores, con una disminución de la viabilidad mientras mayor fue el número de generaciones en que las RHVm de tipo II perdieron esencialidad. Varios autores han planteado que la gran complejidad en el sistema de edición por delección/inserción de U en kinetoplastídicos tiene su ventaja en la fragmentación de genes, que brinda protección contra la pérdida de genes mitocondriales que pierden temporalmente la expresión, al vincular fragmentos no expresados a partes que todavía son necesarias ([Speijer, 2006](#); [Buhrman et al., 2018](#)). Esto permitiría a los organismos desarrollar ciclos de vida complejos, ya que obliga a retener genes que no están bajo presión selectiva durante periodos prolongados de crecimiento y división, reteniendo así una mayor flexibilidad ecológica ([Speijer, 2008](#)). Sin embargo, debido a que es probable que el ligamiento de las RHVm en un minicírculo ocurra de manera aleatoria, es posible que muchas clases de RHVm de tipo II ("parcialmente esenciales") no siempre se encuentren ligadas a las RHVm de tipo I (esenciales), y su pérdida en alguna fase del ciclo de vida del parásito hace imposible su pasaje al siguiente estadio. De igual manera, aquellos minicírculos que presenten ligamiento entre RHVm de tipo III (no esenciales), de tipo II y de tipo I redundantes serían susceptibles a la pérdida en un determinado estadio del parásito, sin afectar la viabilidad del mismo, pero imposibilitando continuar el ciclo.

Por el contrario, en todas las pruebas que incluyeron un ciclo de vida en un único hospedador fue claro que el ligamiento de RHVm les otorga una ventaja a los parásitos. Esto es posiblemente debido a que el ligamiento implica que el parásito requiera menor diversidad de minicírculos para mantener la edición y por ende menor probabilidad de perder una clase de minicírculo por azar. Probablemente este ligamiento resulte favorable en las especies que requieren una gran diversidad de ARNg, asegurando el mantenimiento de al menos una copia de cada clase de RHVm requerida para la correcta edición de sus ARNm mitocondriales, lo que aumentaría la viabilidad celular. Mientras que, por otro lado, las especies

que no presentan ligamiento de sus RHVm es probable que sean más susceptibles a perder algunas clases como consecuencia de la segregación aleatoria (o parcialmente aleatoria) y por ende su viabilidad también disminuye. Se ha propuesto en estudios anteriores que el grado de heterogeneidad en las secuencias de los minicírculos parece reflejar el número de ARNg necesarios para la edición. Así, las especies que tienen una pan-edición de sus ARNm mitocondriales presentan mayor heterogeneidad y mayor número de RHVm por minicírculo, como sucede en *T. brucei* con más de 250 clases de minicírculos y alrededor de 3-5 ARNg codificados en cada uno de ellos ([Shapiro & Englund, 1995](#); [Koslowsky et al., 2014](#); [Cooper et al., 2019](#)). Por otro lado, las cepas con un nivel de edición más bajo, como algunas cepas de laboratorio de *Leishmania tarentolae*, probablemente no tengan más de 17 clases de minicírculos diferentes, cada uno de ellos codificando un solo ARNg ([Maslov & Simpson, 1992](#); [Shapiro & Englund, 1995](#)). De igual manera, se observó en *Crithidia fasciculata* que más del 90% de los minicírculos tenían aproximadamente la misma secuencia, y en *Trypanosoma equiperdum* y *T. evansi* los minicírculos son prácticamente homogéneos, quienes además no pueden producir los citocromos y otras proteínas mitocondriales que les permitan la vida en el vector tsé-tsé ([Shapiro & Englund, 1995](#)).

En este estudio se propuso que el aumento en el tamaño de la red de minicírculos podría ser beneficioso para los parásitos por permitir el mantenimiento de una mayor diversidad de clases de RHVm. Sin embargo, nuestros resultados han mostrado solo a corto plazo una ventaja brindada por los mayores tamaños de la red de minicírculos, mientras que, a largo plazo la viabilidad celular no se vio influenciada por la variación en dicho tamaño. Esto difiere de lo observado anteriormente por [Savill & Higgs](#) (1999) en un modelo de simulación por computadora, ya que sus hallazgos predecían que en una población el tamaño promedio de la red de minicírculos podía variar en escalas de tiempo largas y la viabilidad celular aumentaba a medida que lo hacía el tamaño de dicha red, lo que implica una presión selectiva para tamaños de redes más grandes. Esta discordancia hallada entre ambos estudios podría relacionarse con el hecho de que nuestro modelo se inicializa con una distribución relativamente homogénea de la frecuencia de cada clase de minicírculo, por lo que, en principio, la probabilidad de perder una clase es menor cuanto mayor es el tamaño de la red. No obstante, a medida que pasan las generaciones y considerando que existe un cierto grado de segregación aleatoria, cada clase va cambiando su frecuencia. Como consecuencia, unas pocas clases resultan abundantes en frecuencia, mientras que la gran mayoría de clases son poco abundantes. Esto convierte a los modelos con diferente tamaño de red dinámicamente muy similares, en donde todos presentan baja frecuencia de gran parte de las clases de minicírculos y por lo tanto las probabilidades de perder una clase esencial son las mismas independientemente del tamaño de la red. Por ello, a largo plazo la probabilidad de que se extingan es la misma y no existe una ventaja dada por el tamaño de la red de minicírculos.

Se ha observado también que, a medida que aumenta el número de SiRE la viabilidad celular disminuye, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que a mayor número de SiRE mayor es la diversidad de clases de RHVm requerida para la supervivencia del parásito. Sin un aumento en el tamaño de la red, una mayor diversidad de clases de RHVm también significa un menor número de copias de cada una de ellas, lo cual podría aumentar la susceptibilidad a ser perdidas. Varios autores han sugerido que no sería sorprendente, considerando su inmensa complejidad y costes energéticos, que actualmente la pan-edición parezca desventajosa y esté desapareciendo con el tiempo, por ejemplo, debido a la pérdida de genes de ARNg ([Speijer, 2006](#)). La especie *Trypanoplasma borreli* (Orden Bodonida), que demostró la existencia de edición del tipo inserción / deleción de U de ARNm indica que el proceso tiene al menos

entre 500-700 millones de años, por lo que, resulta evidente que el proceso de pan-edición corresponde al estado ancestral del linaje de los kinetoplástidos. Con apoyo en el descubrimiento de una transcriptasa inversa en *Crithidia fasciculata* se propuso que, durante el curso de la evolución, es posible una pérdida de complejidad en el sistema de edición. Esto podría ocurrir por una retrotranscripción de ARNm editados (o parcialmente editados) y posteriormente una retrotransposición del ADNc en el genoma mitocondrial, por recombinación homóloga de las regiones conservadas en los extremos 3' y 5' que flanquean a la región editada (presentes tanto en el gen como en el ARNm maduro) ([Landweber, 1992](#); [Arts & Benne, 1996](#)). Con estudios basados en varios transcritos de diferentes especies de kinetoplástidos se observaron distintos grados de edición, y particularmente se encontró que las especies más ancestrales dentro del linaje de los kinetoplástidos albergan más transcritos pan-editados que las especies más avanzadas ([Landweber, 1992](#); [Arts & Benne, 1996](#)). De esta forma, la edición se vuelve progresivamente menos extensa en especies de evolución más reciente, incluso llegando a desaparecer por completo, tal como ocurre con la edición del gen Cox3 en *Blastocrithidia culicis* o como se ha observado en cepas cultivadas de *Leishmania tarentolae* que muestran un menor potencial de edición tras un cultivo prolongado ([Speijer, 2006](#); [Speijer, 2008](#); [Buhrman et al., 2018](#)).

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo han mostrado que el aumento en la proporción de clases de RHVm de tipo III produce una disminución en la diversidad de las RHVm de tipo I y, consecuentemente, una menor viabilidad celular. Esta situación podría considerarse análoga a lo observado por [Savill & Higgs](#) (1999) en un trabajo de simulación por computadora, donde plantean un modelo de evolución de micicirculos. Allí proponen que las clases de micicirculos con varios genes de ARNg funcionales pueden perderse de la población por deriva y, como resultado de la mutación, podrían reemplazarse por más clases de micicirculos que contienen menos genes de ARNg funcionales, con la condición de que las células mantengan un complemento completo de ARNg funcionales. Así, las mutaciones conducirían a un número creciente de clases de micicirculos e inevitablemente a un solo ARNg funcional por micicirculo, lo que lleva a una pérdida de viabilidad celular. En nuestro modelo el aumento en la proporción de clases de RHVm de tipo III podría reducir el ligamiento de las clases de RHVm de tipo I, dando como resultado micicirculos con pocos genes de ARNg funcionales. Esto facilita la pérdida de algunas clases de micicirculos y con ella la pérdida de diversidad de las RHVm de tipo I, tal y como ocurre en los modelos sin ligamiento de las RHVm. Esto conduciría también a una disminución en la viabilidad celular.

Además, se observó en los resultados una coincidencia con [Savill & Higgs](#) (2000) en la propuesta de que los ARNg no esenciales no deberían persistir en especies que tienen un solo ARNg por micicirculo, ya que el número de copias de éstas podría disminuir por deriva de los micicirculos hasta perderse, sin afectar la supervivencia del parásito. De hecho, los datos obtenidos en este trabajo mostraron una gran disminución en el número de clases de RHVm de tipo III en modelos sin ligamiento de las RHVm, mientras que, en los modelos con ligamiento de RHVm el número se mantuvo bastante elevado, representando hasta un 35% del total de clases de RHVm. Esto podría deberse a que los micicirculos que presenten clases de RHVm de tipo I y tipo III ligadas se mantendrían debido al requerimiento de los ARNg codificados por las RHVm de tipo I, mientras que, los micicirculos que presentan una sola RHVm permitiría la pérdida de aquellos micicirculos que lleven una RHVm de tipo III debido a su falta de requerimiento para la supervivencia del parásito.

Estos resultados permitirán continuar explorando la influencia del intercambio genético sobre la diversidad de las RHVm y la viabilidad de las poblaciones de parásitos, y así poder comparar los datos obtenidos del modelo con los datos de diversidad obtenidos en cepas reales de *Trypanosoma cruzi*. Con ello se podría evaluar el ajuste del modelo a los datos para intentar determinar qué procesos evolutivos son más factiblemente los causantes de la diversidad y estructura genética de las poblaciones de esta especie. Además, es importante destacar que desde hace tiempo los minicírculos en el ADN kinetoplastídico de *Trypanosoma cruzi* han sido uno de los blancos del diagnóstico molecular de mayor sensibilidad para detectar el parásito en muestras de sangre, y el análisis de la diversidad de las RHVm y su dinámica evolutiva es de interés para el desarrollo de marcadores de tipificación altamente sensibles y con alto poder de resolución.

6. Conclusiones

Este trabajo ha permitido comprender el efecto de diversos factores sobre la diversidad de las RHVm y la viabilidad de las poblaciones de parásitos. Se ha observado que el ligamiento de las RHVm en un minicírculo resulta ventajoso en aquellas poblaciones que presentan un ciclo de vida en un único hospedador. Por el contrario, en los ciclos de vida con una alternancia de hospedadores la ventaja del ligamiento de las RHVm solo se observó a medida que aumenta el grado de segregación aleatoria, aunque dicho beneficio cayó drásticamente al aumentar el número de generaciones en un hospedador donde no existe presión selectiva sobre algunas RHVm, lo que hace posible su pérdida. Por todo lo expuesto anteriormente, es difícil justificar que sea correcta la hipótesis del "fraccionamiento génico", que propone que algunos ARN guías que no son requeridos en todas las etapas del ciclo vital podrían ser mantenidos por encontrarse ligados a otras regiones que sí lo son. Contrariamente, lo observado concuerda con otros autores, en que en ausencia de presiones selectivas sobre la actividad mitocondrial, la pérdida de ARNg y la pérdida de heterogeneidad de los minicírculos parece ocurrir con bastante rapidez debido a divisiones asimétricas de la red de ADNk.

7. Referencias bibliográficas

- Arts, G. J., & Benne, R. (1996). Mechanism and evolution of RNA editing in kinetoplastida. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1307(1), 39-54.
- Buhrman, H., van der Gulik, P., Severini, S., & Speijer, D. (2013). A mathematical model of kinetoplastid mitochondrial gene scrambling advantage. *arXiv preprint arXiv:1307.1163*.
- Brunet, T. D. P., & Doolittle, W. F. (2018). The generality of constructive neutral evolution. *Biology & Philosophy*, 33(1), 1-25.
- CABI (2021). *Trypanosoma*. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc.
- Carranza, J. C., A. J. Kowaltowski, M. A. G. Mendonca, T. C. de Oliveira, F. R. Gadelha & B. Zingales. (2009). Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *J Bioenerg. Biomembr.* 41:299-308.
- Callejas-Hernández, F., Herreros-Cabello, A., del Moral-Salmoral, J., Fresno, M., & Gironès, N. (2021). The complete mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: Maxicircles and minicircles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11.
- Cooper, S., Wadsworth, E. S., Ochsenreiter, T., Ivens, A., Savill, N. J., & Schnaufer, A. (2019). Assembly and annotation of the mitochondrial minicircle genome of a differentiation-competent strain of *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research*, 47(21), 11304-11325.
- de Oliveira, L. C., et al. (2020). ELISA saliva for *Trypanosoma cruzi* antibody detection: an alternative for serological surveys in endemic regions. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 102(4), 800.
- Dinatale B., Bulfoni Balbi C., González F. B., Pérez A. R. & Pacini M. F. (2020). Desarrollos preclínicos de vacunas profilácticas contra la Enfermedad de Chagas basadas en Transialidasa. *Rev Fac Cs Méd UNR*. Vol. 1: pp. 23 a 38
- Engel, J. C., Doyle, P. S., & Dvorak, J. A. (1985). *Trypanosoma cruzi*: Biological Characterization of Clones Derived from Chronic Chagasic Patients. II. Quantitative Analysis of the Intracellular Cycle 1. *The Journal of protozoology*, 32(1), 80-83.
- Flegontov, P., Gray, M. W., Burger, G., & Lukeš, J. (2011). Gene fragmentation: a key to mitochondrial genome evolution in Euglenozoa?. *Current genetics*, 57(4), 225-232.
- Hernández, R., Cevallos, A. M., Nepomuceno-Mejía, T., & López-Villaseñor, I. (2012). Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitology research*, 111(2), 509-514.
- Jansen, A. M., Xavier, S. C. D. C., & Roque, A. L. R. (2020). Landmarks of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 10.
- Kollien, A., & Schaub, G. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology today*, 16(9), 381-387.
- Koslowsky, D., Sun, Y., Hindenach, J., Theisen, T., & Lucas, J. (2014). The insect-phase gRNA transcriptome in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic acids research*, 42(3), 1873-1886.
- Landweber, L. F. (1992). The evolution of RNA editing in kinetoplastid protozoa. *BioSystems*, 28(1-3), 41-45.

- Lima, L., et al. (2015). Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015;151:166-177.
- Lukeš, J., Hashimi, H., & Zíková, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current genetics*, 48(5), 277-299.
- Lukeš, J., Archibald, J. M., Keeling, P. J., Doolittle, W. F., & Gray, M. W. (2011). How a neutral evolutionary ratchet can build cellular complexity. *IUBMB life*, 63(7), 528-537.
- Maslov, D. A., & Simpson, L. (1992). The polarity of editing within a multiple gRNA-mediated domain is due to formation of anchors for upstream gRNAs by downstream editing. *Cell*, 70(3), 459-467.
- Muñoz-Gómez, S. A., Bilollikar, G., Wideman, J. G., & Geiler-Samerotte, K. (2021). Constructive neutral evolution 20 years later. *Journal of Molecular Evolution*, 1-11.
- Pereda, M., & Zamarreño, J. M. (2015). Modelado Basado en Agentes: un Enfoque desde la Ingeniería de Sistemas. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, 12(3), 304-312.
- Ragone, P. G., et al. (2015). Experimental evidence of biological interactions among different isolates of *Trypanosoma cruzi* from the Chaco Region. *PLoS one*, 10(3), e0119866.
- Ramírez, J. D., & Llewellyn, M. S. (2014). Reproductive clonality in protozoan pathogens—truth or artefact?. *Molecular ecology*, 23(17), 4195-4202.
- Ramirez-Barríos, R., Susa, E. K., Smoniewski, C. M., Faacks, S. P., Liggett, C. K., & Zimmer, S. L. (2020). A link between mitochondrial gene expression and life stage morphologies in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular microbiology*, 113(5), 1003-1021.
- Rey, J., Kobylinski, K., & Connelly, R. R. (2006). La tripanosomiasis americana-Mal de Chagas. *EDIS*, 2006(28).
- Rodríguez Zoya, L. G. & Roggero, P. (2015). Modelos basados en agentes: aportes epistemológicos y teóricos para la investigación social. *Revista mexicana de ciencias políticas y sociales*, 60(225), 227-261.
- Rosiñol, R., Flores, D. L., Gómez, C. M., & Guerra-Rivas, G. (2013). El uso de herramientas de simulación basadas en agentes en sistemas biológicos. *Reunión Internacional de Otoño, ROC&C'.*
- Rusman, F., Tomasini, N., Yapur, N. F., Puebla, A. F., Ragone, P. G., & Diosque, P. (2019). Elucidating diversity in the class composition of the minicircle hypervariable region of *Trypanosoma cruzi*: New perspectives on typing and kDNA inheritance. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(6), e0007536.
- Rusman, F., N. Floridia-Yapur, P. G. Ragone, P. Diosque & N. Tomasini. (2020). Evidence of hybridization, mitochondrial introgression and biparental inheritance of the kDNA minicircles in *Trypanosoma cruzi* I. *PLoS Negl Trop Dis* 14(1): e0007770.
- Rusman, F., Floridia-Yapur, N., Tomasini, N., & Diosque, P. (2021). Guide RNA Repertoires in the Main Lineages of *Trypanosoma cruzi*: High Diversity and Variable Redundancy Among Strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 473.
- Savill, N. J. & Higgs, P. G. (1999). A theoretical study of random segregation of minicircles in trypanosomatids. *Proc Biol Sci.* 266(1419):611-620.
- Savill, N. J. & Higgs, P. G. (2000). Redundant and non-functional guide ARN genes in *Trypanosoma brucei* are a consequence of multiple genes per minicircle. *Gene*. 256(1-2):245-252.

- Schmid-Hempel, R., Salathé, R., Tognazzo, M., & Schmid-Hempel, P. (2011). Genetic exchange and emergence of novel strains in directly transmitted trypanosomatids. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 564-571.
- Schwabl P., H. Imamura, F. Van den Broeck, J. A. Costales, J. Maiguashca-Sánchez, M. A. Miles, B. Andersson, M. J. Grijalva & M. S. Llewellyn. (2019). Meiotic sex in Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Nat Commun*. 10(1):3972.
- Shapiro, T. A., & Englund, P. T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual review of microbiology*, 49(1), 117-143.
- Shaw, A. K., M. C. Kalem & S. L. Zimmer. (2016). Mitochondrial Gene Expression Is Responsive to Starvation Stress and Developmental Transition in *Trypanosoma cruzi*. *mSphere* 1(2): e00051-16.
- Simpson, L. (1997). RNA editing. En: The origins of life, pp. 501-516.
- Simpson, L., Sbicego, S., & Aphasizhev, R. (2003). Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria: a complex business. *Rna*, 9(3), 265-276.
- Speijer, D. (2006). Is kinetoplastid pan-editing the result of an evolutionary balancing act?. *IUBMB life*, 58(2), 91-96.
- Speijer, D. (2008). Evolutionary Aspects of RNA Editing en H. Ulrich Göringer (Ed.), *RNA Editing. Nucleic Acids and Molecular Biology 20* (1ra Ed., pp. 199-227). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. H.U.
- Speijer, D. (2011). Does constructive neutral evolution play an important role in the origin of cellular complexity? Making sense of the origins and uses of biological complexity. *Bioessays*, 33(5), 344-349.
- Sturm, N. R., Degraeve, W., Morel, C., & Simpson, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and biochemical parasitology*, 33(3), 205-214.
- Telleria, J., Lafay, B., Virreira, M., Barnabé, C., Tibayrenc, M., & Svoboda, M. (2006). *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental parasitology*, 114(4), 279-288.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., & Ayala, F. J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2414-2418.
- Tibayrenc, M., & Ayala, F. J. (2018). A misleading description of the predominant clonal evolution model in *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 187(Infect. Genet. Evol 54 2017), 13-14.
- Tibayrenc, M., & Ayala, F. J. (2020). Genomics and high-resolution typing confirm predominant clonal evolution down to a microevolutionary scale in *Trypanosoma cruzi*. *Pathogens*, 9(5), 356.
- Tomasini, N. (2018). Introgression of the kinetoplast DNA: an unusual evolutionary journey in *Trypanosoma cruzi*. *Current genomics*, 19(2), 133-139.
- Tyler, K. M., Olson, C. L., & Engman, D. M. (2003). The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. In *American Trypanosomiasis* (pp. 1-11). Springer, Boston, MA.
- Zingales, B., et al. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution*, 12(2), 240-253.

8. Anexo

<https://mfr.osf.io/render?url=https://osf.io/mc4pj/?direct%26mode=render%26action=download%26mode=render>