

Tesis Doctoral

Búsqueda de extractos naturales con propiedades antiparasitarias y nuevos blancos moleculares para la terapia contra la enfermedad de Chagas

Mild, Jesica Gabriela

2016-04-14

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mild, Jesica Gabriela. (2016-04-14). Búsqueda de extractos naturales con propiedades antiparasitarias y nuevos blancos moleculares para la terapia contra la enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mild, Jesica Gabriela. "Búsqueda de extractos naturales con propiedades antiparasitarias y nuevos blancos moleculares para la terapia contra la enfermedad de Chagas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-04-14.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Búsqueda de extractos naturales con propiedades antiparasitarias y nuevos blancos moleculares para la terapia contra la Enfermedad de Chagas

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Lic. Jesica G. Mild

Director de Tesis: Dr. Martín M. Edreira
Consejero de Estudios: Dr. Eduardo T. Canepa

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica - Instituto de Química Biológica,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN, UBA-CONICET)

Buenos Aires, 2016

Resumen

Los tratamientos disponibles contra la Enfermedad de Chagas son poco efectivos y pueden presentar efectos secundarios severos. Existe una urgente necesidad de encontrar nuevos blancos moleculares y nuevas terapias antiparasitarias. El primer objetivo de este trabajo consistió en la búsqueda de extractos naturales con capacidad de interrumpir interacciones entre proteínas que participan en procesos esenciales del parásito y presentan características divergentes respecto de su contraparte en humanos. El rastreo se realizó sobre la interacción entre las proteínas p14 y Sf3b155 a través de un ensayo basado en la transferencia de energía resonante bioluminiscente (BRET). Contrariamente al objetivo original, encontramos que un extracto de *Nardophyllum bryoides* provocó un aumento de la señal de BRET, lo cual reflejaría su capacidad de modular positivamente la interacción; asimismo, el extracto presentó propiedades antiproliferativas sobre cultivos de epimastigotes.

Por otra parte, se planteó la identificación de nuevos blancos moleculares a partir de dos estrategias. La primera se basó en la caracterización de potenciales interacciones entre proteínas del parásito, en particular, a través de la búsqueda de ligandos de una proteína exclusiva de *T. cruzi*, TcCLB.504427.180, que presenta dominios WW y podría participar en diversos procesos fisiológicos. La segunda, se enfocó en la búsqueda de nuevos efectores de la vía del AMPc en *T. cruzi*. Si bien la primera estrategia no arrojó resultados positivos, el segundo enfoque nos permitió demostrar que la proteína TcCLB.508523.80 es capaz de unir AMPc y que podría estar involucrada en la invasión de la célula hospedadora. Estas evidencias sugieren que TcCLB.508523.80 sería un novedoso sensor primario del AMPc en la biología del parásito.

Palabras claves: *T. cruzi*, blanco de drogas, interacciones proteína-proteína, ensayo de BRET, dominios WW, dominios de unión a AMPc.

Search for natural extracts with antiparasitic properties and novel molecular targets for the therapy against Chagas Disease

Abstract

Available treatments against Chagas Disease are not completely effective and may present severe side effects. There is an urgent need to find new molecular targets and new antiparasitic therapies. The first objective of this work was to search for natural extracts with the ability to interrupt interactions between proteins that are involved in essential processes of the parasite and possess divergent characteristics regarding its human counterparts. The screen was performed on the interaction between the proteins p14 and Sf3b155 through a bioluminescent resonance energy transfer (BRET) assay. Contrary to the original goal, we found that an extract of *Nardophyllum bryoides* caused an increase in BRET signal, which might reflect its ability to positively modulate the interaction; in accordance, the extract showed antiproliferative properties on epimastigote cultures.

Moreover, we intended to identify new molecular targets by using two approaches. The first was based on the characterization of potential interactions between parasite proteins, in particular, through searching ligands for TcCLB.504427.180, a *T. cruzi* exclusive protein, which contains WW domains and could be involved in various physiological processes. The second, was focused on finding new effectors of the cAMP pathway in *T. cruzi*. While the first strategy showed no positive results, the second approach allowed us to demonstrate that the protein TcCLB.508523.80 is able to bind cAMP and could be involved in host cell invasion. These evidences suggest that TcCLB.508523.80 could be a novel primary cAMP sensor in the parasite biology.

Keywords: *T. cruzi*, drug target, protein-protein interactions, BRET assay, WW domains, cAMP-binding domains.

Gracias:

A mi director el Dr. Martín Edreira por la oportunidad de incorporarme en su grupo de trabajo y por contribuir con mi formación científica.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al CONICET por la financiación de las becas que me permitieron desarrollar esta Tesis.

Al Dr. Eduardo Canepa por el asesoramiento.

Al Dr. Jorge Palermo por la codirección de la beca CONICET, la colaboración con los extractos naturales y la revisión del capítulo I esta Tesis.

Al Dr. Juan Iovanna y el Dr. Nelson Dusetti por abrirme las puertas de su laboratorio en Marsella y permitirme trabajar con total independencia.

A la Dra. Odile Gayet por su enseñanza y paciencia con los ensayos de BRET.

A la Dra. Adriana Jager y el Dr. Javier De Gaudenzi por la colaboración con los ensayos de unión a AMPc y el alineamiento múltiple de secuencias.

Al Dr. Federico Coluccio Leskow y todo su grupo por permitirme utilizar cientos de veces el equipo PHERAstar FS.

A mis compañeros de laboratorio: Daniel Musikant, Lucía Fernández, Gabriel Ferri y Clarisa Schiavi y los que formaron parte del grupo anteriormente. A mis compañeros de agrobiotecnología con quienes compartí los primeros años de laboratorio.

A mis amigas más cercanas: Eugenia Incera, Mariana Cooke, Raquel Baabour, Mariela Gangemi, Mariana Regueira y especialmente, Amparo Lago por su ayuda siempre.

A mi familia, en especial a mis padres que siempre, pero siempre me acompañan. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

"Identification of novel cyclic nucleotide binding proteins in *Trypanosoma cruzi*".

Jager, Adriana¹, De Gaudenzi, Javier¹, Mild, Jesica², Mc Cormack, Bárbara², Pantano, Sergio, Alschuler, Daniel y Edreira, Martín (2014). *Journal of Molecular and Biochemical Parasitology* **198**(2): 104-112. PMID: 25724722.

Índice

Introducción general

Abreviaturas

Introducción general

1. La Enfermedad de Chagas	1
1.1. Epidemiología y transmisión.....	1
1.2. Etapas de la enfermedad	2
1.3. Drogas tripanocidas: tratamiento etiológico de la enfermedad.....	3
2. El <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.1. Clasificación taxonómica	4
2.2. Poblaciones de <i>T. cruzi</i>	4
2.3. Estadios de desarrollo	5
2.4. Ciclo de vida.....	6
2.5. Organización del genoma nuclear	7
2.6. Características particulares que lo distinguen del hospedador humano	8
2.6.1. El kinetoplasto	8
2.6.2. Los glicosomas	9
2.6.3. Expresión génica	9
2.6.3.1. Transcripción policistrónica	9
2.6.3.2. Ausencia de secuencias consenso promotoras para la ARN polimerasa II.....	10
2.6.3.3. Procesamiento del ARNm por <i>trans-splicing</i>	10
3. Búsqueda de nuevos tratamientos contra la Enfermedad de Chagas	11
3.1. Las interacciones proteína-proteína como blancos moleculares originales para el desarrollo de una nueva generación de medicamentos.....	12

Capítulo I: Búsqueda de extractos de origen natural con propiedades antiparasitarias

Introducción	14
1. La tecnología BRET.....	14
1.1. Parámetros que afectan la señal de BRET.....	15
2. El ensayo de BRET en rastreos de drogas.....	16
2.1. Consideraciones para el ensayo de BRET en un rastreo de inhibidores de IPPs.....	18
3. Hipótesis y objetivo general.....	20
4. Generalidades de las IPPs consideradas para el rastreo de inhibidores.....	21
Resultados	24
1. Generación de proteínas de fusión dadoras yceptoras de energía para el ensayo de BRET.....	24
2. Estudio de IPPs de <i>T. cruzi</i> mediante el ensayo de BRET.....	24
2.1. Ensayo de BRET en células vivas.....	25
2.1.1. Interacciones entre proteínas P ribosomales.....	25
2.1.2. Interacciones entre proteínas del procesamiento del ARNm.....	27
2.2. Ensayo de BRET en lisados celulares.....	28
2.2.1. Interacciones entre proteínas P ribosomales.....	29
2.2.2. Interacciones entre proteínas del procesamiento del ARNm.....	30
3. Búsqueda de principios activos.....	32
4. Estudios complementarios del extracto de <i>Nardophyllum bryoides</i>	42
4.1. Efecto del extracto sobre la interacción U2AF65/SF1.....	42
4.2. Efecto de una fracción rica en ácido secochilolídico sobre la interacción Sf3b155/p14.....	43
4.3. Propiedades antiparasitarias del extracto de <i>Nardophyllum bryoides</i>	44
4.4. Citotoxicidad del extracto de <i>Nardophyllum bryoides</i>	45
Discusión	47

Capítulo II: Búsqueda de nuevos blancos moleculares para la terapia de la Enfermedad de Chagas: proteínas que contienen dominios WW

Introducción	57
1. Generalidades de las proteínas que contienen dominios WW	57
2. Identificación y clasificación de los dominios WW.....	57
3. Estructura de los dominios WW	59
4. Identificación y clasificación de proteínas que contienen dominios WW en <i>T. cruzi</i>	61
5. Identificación de ligandos de proteínas que contienen dominios WW en <i>T. cruzi</i>	64
6. Hipótesis y objetivo general	64
Resultados	66
1. Caracterización bioquímica de la proteína WW12 de <i>T. cruzi</i>	66
1.1. Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína WW12.....	66
1.2. Expresión endógena de la proteína WW12 durante el ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	68
1.3. Localización subcelular de la proteína WW12 en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	69
2. Búsqueda de interacciones proteína-proteína para WW12	70
2.1. Análisis de interacciones entre WW12 y proteínas que contienen motivos peptídicos ricos en prolina en <i>T. cruzi</i>	70
2.2. Búsqueda de pares de interacción para la proteína WW12 por rastreo de lisados de epimastigotes.....	72
2.3. Búsqueda de pares de interacción para la proteína WW12 por rastreo de una biblioteca de ADNc de epimastigotes	73
Discusión	75

Capítulo III: Búsqueda de nuevos blancos moleculares para la terapia de la Enfermedad de Chagas: proteínas que contienen dominios de unión a AMPc

Introducción	79
1. Generalidades de las vías de señalización mediadas por AMPc.....	79
2. Características de los dominios de unión a AMPc	80
3. Señalización mediada por AMPc en trypanosomátidos.....	81
3.1. Rol del AMPc en trypanosomátidos.....	81

3.2. Efectores del AMPc en trypanosomátidos	83
3.3. Identificación de proteínas putativas que contienen dominios de unión a nucleótidos cíclicos en <i>T. cruzi</i>	85
3.4. Características de los CBDs de <i>T. cruzi</i>	89
4. Hipótesis y objetivo general	90
Resultados	92
1. Caracterización bioquímica de proteínas que contienen dominios de unión a AMPc en <i>T. cruzi</i>	92
2. Validación funcional de TcCLB.508523.80 como efector del AMPc en <i>T. cruzi</i>	96
2.1. Efecto de TcCLB.508523.80 sobre la invasión celular mediada por AMPc en <i>T. cruzi</i>	96
2.2. Generación de una proteína dominante negativa de TcCLB.508523.80	99
3. Búsqueda de pares de interacción de la proteína TcCLB.508523.80 en lisados de trypomastigotes de <i>T. cruzi</i>	100
Discusión	105
Materiales y métodos	
Materiales	111
1. Cepas	111
1.1. <i>Escherichia coli</i>	111
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	111
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	111
2. Líneas celulares.....	112
3. Anticuerpos.....	112
4. Plásmidos	112
Métodos	118
1. Mantenimiento de cultivos celulares	118
1.1. Células HEK 293T	118

1.2. Epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	118
2. Transfección celular.....	118
2.1. Transfección transitoria de células HEK 293T	118
2.2. Transfección estable de <i>T. cruzi</i>	119
3. Preparación de bacterias competentes.....	119
3.1. Competentes químicas.....	119
3.2. Electrocompetentes.....	120
4. Transformación bacteriana	120
4.1. Transformación química	120
4.2. Electroporación	120
5. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos	120
5.1. Extracción de ADN genómico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	120
5.2. Preparación de ADN plasmídico.....	121
5.2.1. Minipreparación	121
5.2.2. Midi y maxipreparación	121
5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	121
5.4. Colony PCR	122
5.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	122
5.6. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	122
5.7. Adición de dATP en el extremo 5'-terminal del ADN.....	122
5.8. Digestión con enzimas de restricción	123
5.9. Clonado de ORFs.....	123
5.10. Subclonado de ORFs	124
5.11. Mutagénesis sitio dirigida	125
6. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias.....	125
6.1. Prueba piloto de expresión.....	125
6.2. Obtención de proteínas recombinantes	126
6.3. Lisis bacteriana	126

6.3.1. Lisis en condiciones no desnaturalizantes	126
6.3.2. Lisis en condiciones desnaturalizantes	126
6.4. Purificación.....	127
6.4.1. Purificación de proteínas de fusión a GST por resinas de agarosa-GSH	127
6.4.2. Purificación de proteínas de fusión a un <i>tag</i> de histidinas por resinas de agarosa Ni-NTA.....	127
7. Análisis de proteínas.....	128
7.1. Determinación de la concentración proteica	128
7.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	128
7.3. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	128
7.3.1. Tinción con azul de Coomassie	128
7.3.2. Tinción con azul de Coomassie en suspensión coloidal.....	129
7.4. Western blot.....	129
7.5. Dot blot.....	130
8. Ensayo de BRET	130
8.1. Curva de saturación del dador de energía en células vivas	130
8.2. Curva de saturación del dador de energía en lisados celulares.....	131
8.2.1. Lisis celular mecánica.....	131
8.2.2. Curva de actividad luciferasa	132
8.3. Rastreo de principios activos mediante ensayos de BRET en lisados celulares.....	132
8.3.1. Ensayo de desplazamiento de la interacción Sf3b155 ¹⁻²⁷⁰ -Rluc/p14-EYFP	132
8.3.2. Control de emisión del dador de energía	133
8.3.3. Control de emisión del aceptor de energía.....	133
8.3.4. Rastreo en condiciones de no saturación del dador de energía.....	133
8.3.5. Rastreo en condiciones de saturación del dador de energía.....	133
8.3.6 Análisis estadístico	134

9. Ensayo de crecimiento de epimastigotes en presencia de un extracto de <i>Nardophyllum bryoides</i>	134
10. Ensayo de viabilidad celular por tinción con cristal violeta	134
11. Obtención de anticuerpos policlonales (protocolo de inmunización)	135
12. Precipitación diferencial	135
12.1. Analisis de interacciones proteína-proteína	135
12.2. Ensayo de unión a AMPc	136
12.2.1. Ensayo de desplazamiento con nucleótidos libres	137
13. Inmunofluorescencia indirecta.....	137
14. Doble híbrido en levaduras	137
14.1. Preparación de levaduras competentes.....	138
14.2. Transformación de levaduras	138
14.3. Rastreo de interacciones por activación de genes reporteros.....	138
14.3.1. Ensayo de actividad de β -galactosidasa por inducción del gen <i>lacZ</i>	138
14.3.2. Crecimiento en ausencia de histidina por inducción del gen <i>HIS3</i>	139
15. Alineamiento múltiple de secuencias que contienen un CBD	139
16. Ensayo de invasión celular de epimastigotes transgénicos.....	139
17. Lisado de parásitos.....	140
Anexo	
Oligonucleótidos (<i>primers</i>).....	141
Referencias	144

Abreviaturas

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

AMPc: adenosina 3', 5' monofosfato cíclico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosina trifosfato

BHT: infusión cerebro corazón triptosa

BSA: seroalbúmina bovina

C-terminal: carboxilo terminal

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DE: desvío estándar

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: 2'-deoxinucleósido 5'-trifosfato

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

GDP: guanosina difosfato

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GSH: glutatión

GST: glutatión S transferasa

GTP: guanosina trifosfato

His: histidina

IgG: inmunoglobulina G

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz-*Time-Of-Flight*

NTA: ácido nitrilotriacético

N-terminal: amino terminal

PBS: *buffer* salino de fosfato

PEG: polietilenglicol

PVDF: polifluoruro de vinilideno

rpm: revoluciones por minuto

Sarkosyl: lauril sarcosinato de sodio

SDS: dodecilsulfato de sodio

SEM: error estándar medio

SFB: suero fetal bovino

TAE: *buffer* acetato-EDTA

TBS: *buffer* salino de Tris

Temed: N, N, N, N'-tetrametilendiamina

UA: unidades arbitrarias

X-GAL: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Introducción general

1. La Enfermedad de Chagas

1.1. Epidemiología y transmisión

La Enfermedad de Chagas, denominada así en reconocimiento al Dr. Carlos Chagas quien la describió por primera vez en el año 1909, es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. También conocida como Tripanosomiasis americana, la enfermedad es endémica en 21 países latinoamericanos, donde prevalece mayoritariamente en regiones rurales pobres, en las que las precarias condiciones de vida facilitan la transmisión del parásito. Se estima que solo en Latinoamérica hay un promedio de 8 millones de personas afectadas, cerca de 100 millones en riesgo de contraer la enfermedad y una incidencia anual de 56.000 nuevos casos y 12.000 muertes (PAHO/WHO 2014). Además, la enfermedad presenta un alto grado de dispersión mundial debido a la migración de individuos infectados a regiones libres de Chagas endémico (Figura 1).

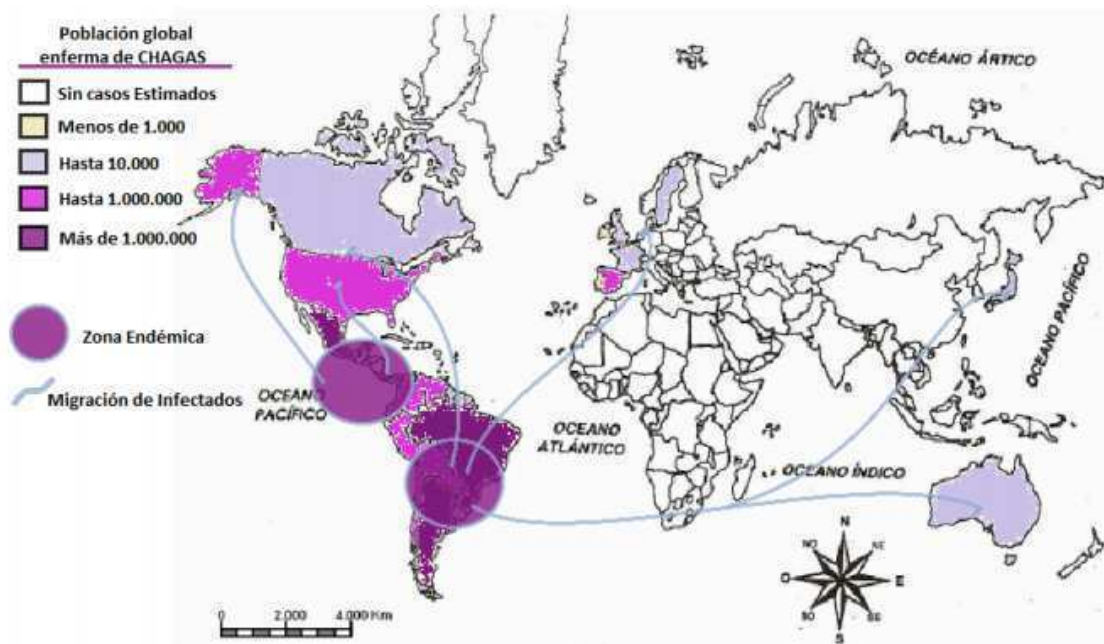


Figura 1. Distribución geográfica de la población mundial enferma de Chagas. Se indican las zonas endémicas y las regiones afectadas por la migración de individuos enfermos. Adaptado de Mc Cormack, B. (2014).

T. cruzi posee dos ecosistemas diferentes, pero que pueden estar conectados entre sí: un ciclo selvático, en el que intervienen pequeños mamíferos salvajes (murciélagos, ratas,

ratones, etc.) y un ciclo doméstico, en el que además del hombre y vectores domiciliados participan reservorios animales como gatos y perros (Coura and Dias 2009).

Una de las principales vías de transmisión de la Enfermedad de Chagas a humanos es vectorial y en América del Sur el vector intermediario más importante es un insecto hematófago de la familia *Reduviidae*, el *Triatoma infestans*, conocido con el nombre de "Vinchuca". Este insecto habita preferentemente en el interior de viviendas rurales, escondido en grietas de paredes de adobe y techos de paja, y presenta hábitos nocturnos, por lo que suele infectar durante la noche (Gurtler, Kitron y col. 2007). La infección adquirida por esta vía afecta en el 84 % de los casos a niños menores de 10 años y el 36 % ocurre antes del primer año de vida (Freilij H B. M. 2007). Otras formas de transmisión de la enfermedad incluyen la infección vertical o congénita, donde una madre infectada contagia a su hijo, principalmente por vía transplacentaria; y con menor frecuencia, la infección adquirida por transfusión de sangre infectada y a través de trasplante de órganos de un donante infectado; la infección por vía oral, debido a la ingesta de alimentos contaminados y por vía endovenosa, en personas usuarias de drogas inyectables o como consecuencia de un accidente de laboratorio (Committee 2002).

1.2. Etapas de la enfermedad

La infección por *T. cruzi* se desarrolla en dos fases, una aguda y una crónica, y cada una presenta características clínicas y criterios de diagnóstico y terapia diferentes.

La fase aguda tiene una duración de 4-8 semanas y se caracteriza por una elevada parasitemia que puede ser detectada por métodos parasitológicos directos y en laboratorios de baja complejidad (Committee 2002). Durante esta fase, la mayoría de los pacientes son asintomáticos o presentan síntomas leves y no específicos tales como fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular, entre otros; por esta razón, las persona infectadas no suelen acudir a una atención clínica inmediata. En la minoría de los casos, la infección aguda puede estar asociada a un chagoma de inoculación (inflamación e hinchazón cutánea del sitio de entrada del parásito) o a una lesión ocular, denominada signo de Romaña (Rassi, Rassi y col. 2010). En el 1 % de los pacientes, la infección aguda es severa con manifestaciones que incluyen miocarditis y meningoencefalitis, y conlleva un importante riesgo de mortalidad (Committee 2002).

La fase crónica de la Enfermedad de Chagas se inicia cuando desaparecen los síntomas clínicos generales y la parasitemia desciende a niveles indetectables por métodos

parasitológicos directos (Committee 2002); no obstante, los parásitos persisten dentro de las células y suelen estar asociados a los sitios donde se ocasionan las lesiones (Levin 1996, Brener and Gazzinelli 1997). Debido a los bajos niveles de parasitemia, la infección es detectable principalmente por métodos serológicos que demuestran la respuesta inmunológica del huésped frente al parásito, y por métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (Committee 2002). Habitualmente, esta etapa suele ser asintomática y silente, y se extiende durante toda la vida del paciente; sin embargo, por razones que aún se desconocen, luego de un período comprendido entre 10-20 años, hasta un 30% de los pacientes desarrollan trastornos cardíacos y un 10%, lesiones del tracto gastrointestinal como megaesófago y/o megacolon que en última instancia llevan a la muerte (Committee 2002).

1.3. Drogas tripanocidas: tratamiento etiológico de la enfermedad

Ante la falta de una vacuna preventiva contra la Enfermedad de Chagas su tratamiento se basa en dos drogas tripanocidas de origen sintético, introducidas en el mercado hace más de 40 años: el Nifurtimox (Lampit[®]), derivado del nitrofurano, y el Benznidazol (Rochagan[®]), derivado del nitroimidazol (Rodrigues Coura and de Castro 2002). Ambos medicamentos son de administración oral y su absorción por vía digestiva es rápida y prácticamente total; el metabolismo es principalmente hepático y sus metabolitos son eliminados por heces y orina (Ministerio de Salud de la Nación 2012). Hasta la fecha, no se conoce el modo de acción exacto, no obstante, se propuso que actuarían a través de una vía reductiva que conduciría a la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales provocarían la peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas y degradación del ADN del parásito (Hall, Bot y col. 2011, Hall and Wilkinson 2012). Estas drogas son altamente eficaces para curar la enfermedad cuando se administran en la fase aguda de la infección; sin embargo, pocos pacientes son diagnosticados durante esta etapa. Por otra parte, su eficacia disminuye a medida que transcurre tiempo desde el inicio de la infección y poseen importantes efectos secundarios, como reacciones cutáneas por hipersensibilidad, disturbios gastrointestinales, cefaleas, vértigo, fatiga, etc. Más aún, el tratamiento posee una duración prolongada (hasta dos meses), las drogas están contraindicadas en pacientes embarazadas y existe una controversia acerca de su indicación a mujeres en periodo de lactancia (Committee 2002, Ministerio de Salud de la Nación 2012, Garcia-Bournissen, Moroni y col. 2015, Salud 2015).

Sumado a estas limitaciones, se reportó la existencia de cepas de *T. cruzi* resistentes a Nifurtimox o Beznidazol (Murta, Gazzinelli y col. 1998).

Teniendo en cuenta que las drogas de uso actual presentan una eficacia limitada y elevada toxicidad para el humano, existe una urgente necesidad de nuevos tratamientos, lo que implica la identificación de nuevos blancos moleculares para la terapia contra la Enfermedad de Chagas.

2. El *Trypanosoma cruzi*

2.1. Clasificación taxonómica

T. cruzi es un protozooario flagelado que pertenece a la familia de los trypanosomátidos, incluida dentro del orden *Kinetoplastida*; todos los miembros de este orden se caracterizan por la presencia de una mitocondria única, de gran tamaño, que los define: el kinetoplasto. Otros microorganismos de este grupo y que también poseen importancia médica son: el *Trypanosoma brucei*, agente causal de la Tripanosomiasis africana; y *Leishmania spp.*, responsable de la enfermedad conocida como Leishmaniasis.

La ubicación sistemática de *T. cruzi* es la siguiente (Levine, Corliss y col. 1980):

Reino: *Animalia*

Subreino: *Protozoa*

Filo: *Sarcomastigophora*

Subfilo: *Mastigophora*

Clase: *Zoomastigophora*

Orden: *Kinetoplastida*

Suborden: *Trypanosomatina*

Familia: *Trypanosomatidae*

Género: *Trypanosoma*

Sección: *Estercoraria*

Especie: *Cruzi*

2.2. Poblaciones de *T. cruzi*

Mediante el análisis de marcadores moleculares y bioquímicos se determinó la existencia de poblaciones de *T. cruzi* que presentan una elevada diversidad genética y biológica.

Inicialmente, por consenso internacional, en el año 1999 se propuso que la población de *T. cruzi* estaría conformada por dos grupos filogenéticos altamente divergentes: *T. cruzi* I, asociado al ciclo selvático y *T. cruzi* II, asociado al ciclo doméstico (1999, Briones, Souto y col. 1999). Sin embargo, análisis posteriores del genoma demostraron una gran heterogeneidad en el linaje de *T. cruzi* II y por lo tanto, se dividió en 5 subgrupos (*T. cruzi* IIa-e) (Brisse, Dujardin y col. 2000). Recientemente, en el consenso de Río de Janeiro de 2009 (Zingales, Andrade y col. 2009), se propuso que cada subgrupo del linaje de *T. cruzi* II debería ser considerado como una unidad discreta de tipificación (UDT) y se modificó la nomenclatura empleada hasta el momento (Tabla 1).

Consenso 1999	Brisse, S. y col., 2000	Consenso 2009
<i>T. cruzi</i> I	-	<i>T. cruzi</i> I
<i>T. cruzi</i> II	<i>T. cruzi</i> IIb	<i>T. cruzi</i> II
	<i>T. cruzi</i> IIc	<i>T. cruzi</i> III
	<i>T. cruzi</i> IIa	<i>T. cruzi</i> IV
	<i>T. cruzi</i> II d	<i>T. cruzi</i> V
	<i>T. cruzi</i> II e	<i>T. cruzi</i> VI

Tabla 1. Nomenclatura de los linajes de *T. cruzi*.

2.3. Estadios de desarrollo

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo e involucra tres estadios de desarrollo definidos morfológica y funcionalmente: epimastigote, trypomastigote y amastigote (de Souza 1984). Los mismos pueden ser identificados por técnicas de microscopía a través de criterios morfológicos y de la posición relativa del kinetoplasto respecto del núcleo (Brenner 1973) (Figura 2).

Epimastigote: estadio replicativo, no infeccioso. Habita en el intestino medio del insecto vector. Posee una morfología fusiforme y el kinetoplasto se localiza por delante del núcleo. El flagelo emerge de la región lateral-anterior, respecto de la dirección de movimiento de la célula.

Trypomastigote: estadio infeccioso, no replicativo. Se encuentra en la ampolla rectal del vector (trypomastigotes metacíclicos) y en sangre periférica de los mamíferos infectados (trypomastigotes sanguíneos). Son células fusiformes, más pequeñas y delgadas que los epimastigotes. El kinetoplasto se sitúa por detrás del núcleo y el flagelo emerge del extremo apical-posterior.

Amastigote: estadio replicativo, no infeccioso. Se localiza en el citoplasma de las células infectadas del huésped mamífero. Son esféricos u ovalados y no presentan flagelo libre.

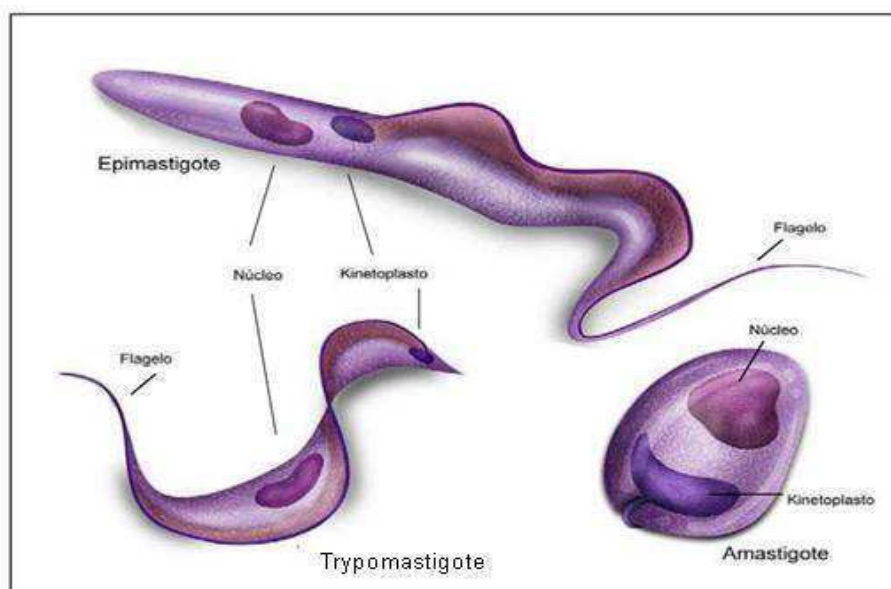


Figura 2. Estadios de *Trypanosoma cruzi*. Adaptado de Eschenazi, B., ilustración para Médicos Sin Fronteras, Fiocruz, Brasil.

2.4. Ciclo de vida

T. cruzi es un parásito digenético, o sea, posee dos hospedadores distintos durante su ciclo de vida: un insecto hematófago y un mamífero. El parásito ingresa al tracto digestivo del insecto vector a través de la ingesta de sangre infectada con trypomastigotes sanguíneos y se diferencia rápidamente al estadio epimastigote. En el intestino medio del triatoma se multiplica por fisión binaria, formando un reservorio de parásitos, y posteriormente, los epimastigotes migran hacia la porción terminal del intestino, donde se adhieren y se diferencian a trypomastigotes metacíclicos. Cuando el vector hematófago infectado vuelve a alimentarse, simultáneamente elimina excreciones sobre la piel del hospedador y deposita trypomastigotes metacíclicos.

La infección en el humano se inicia cuando los trypomastigotes metacíclicos ingresan al torrente sanguíneo a través de las mucosas o heridas en la piel, causadas como consecuencia del rascado debido a la picadura del insecto. Una vez en circulación, infectan distintos tipos celulares, donde se diferencian a la forma amastigote. Luego de varios ciclos de división, los amastigotes se diferencian a trypomastigotes sanguíneos y se liberan al torrente sanguíneo por ruptura de la célula huésped; estos parásitos pueden infectar nuevas células en un nuevo sitio de infección o ser ingeridos por el insecto vector, cuando éste se alimenta de la sangre del mamífero infectado (Figura 3).

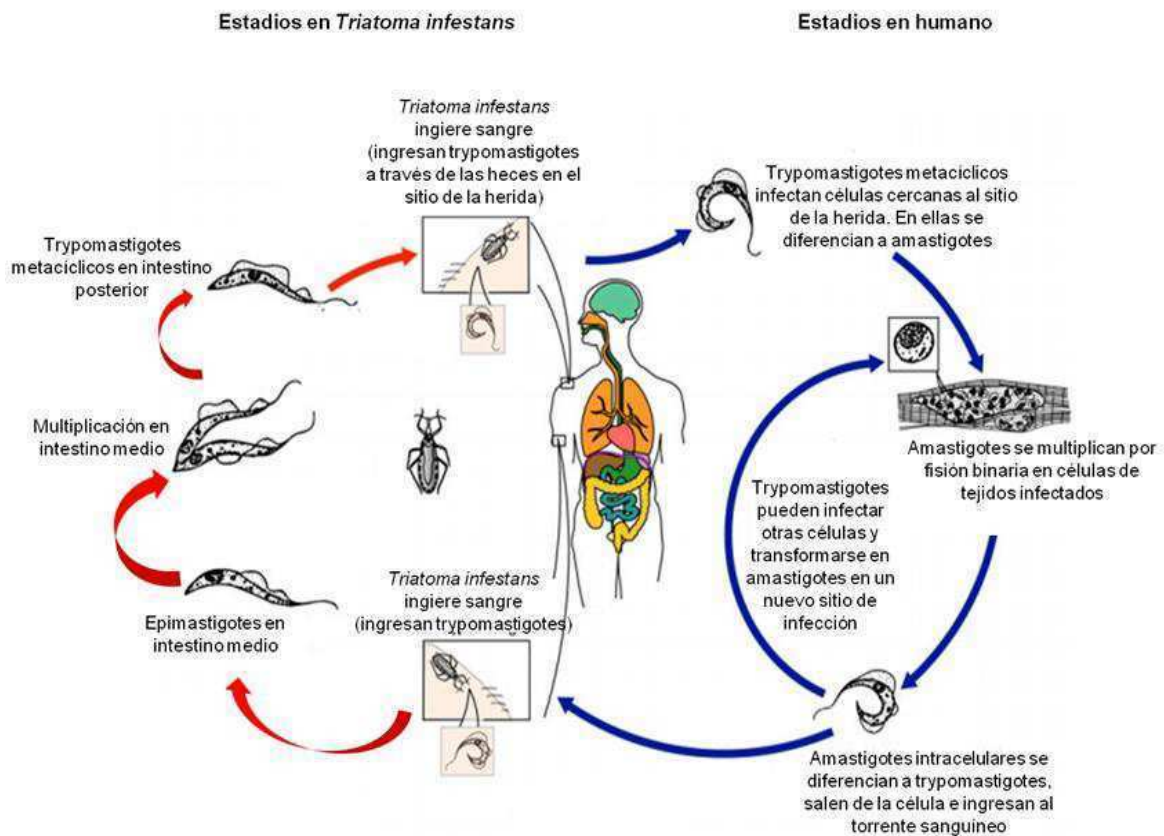


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov>.

2.5. Organización del genoma nuclear

Se estima que el genoma haploide de CL Brener, cepa híbrida elegida como organismo de referencia en el proyecto genoma de *T. cruzi*, tiene un tamaño aproximado de 40-50 mb,

distribuido en 30-40 cromosomas (Committee 2002). El genoma diploide contiene 22.570 genes codificantes, de los cuales 12.570 representan pares de alelos; al menos el 50 % de la secuencia del genoma es repetitiva, constituida por grandes familias génicas de proteínas de superficie, retrotransposones y repeticiones subteloméricas (El-Sayed, Myler y col. 2005).

2.6. Características particulares que lo distinguen del hospedador humano

T. cruzi posee diversas características estructurales y metabólicas que lo diferencian de su hospedador humano. La identificación y caracterización de nuevas rutas metabólicas, especialmente aquellas ausentes en mamíferos, constituye un primer paso para la identificación de nuevos blancos moleculares contra los cuales desarrollar drogas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Algunas de las particularidades del parásito se mencionan a continuación:

2.6.1. El kinetoplasto

Al igual que los demás miembros de la familia *Trypanosomatidae*, *T. cruzi* posee como una de sus características distintivas la arquitectura del genoma mitocondrial. Su ADN mitocondrial está constituido por dos tipos de moléculas, minicírculos y maxicírculos, concatenadas entre sí, que forman una única estructura de red de gran tamaño, denominada kinetoplasto (Simpson 1987) y que representa el 20-25 % del ADN total (Shapiro and Englund 1995).

Los minicírculos son mayoritarios y codifican para los ARN guía, transcritos involucrados en el proceso de “edición” del ARN. Los maxicírculos, varían en tamaño (entre 20-40 kb) y contienen la mayor parte de la información génica mitocondrial, y genes que codifican para ARNr mitocondriales y algunos ARN guía (Pollard, Rohrer y col. 1990, El-Sayed, Myler y col. 2005). Generalmente, los genes codificados por los maxicírculos se encuentran incompletos y los transcritos primarios deben ser sometidos a un proceso postranscripcional de “edición”, en el que participan los mencionados ARN guía. Este proceso resulta en la remodelación de los transcritos por inserción y/o delección de moléculas de uridina, y da lugar a la generación de ARNm mitocondriales maduros y funcionales (Simpson, Aphasizhev y col. 2004, Lukes, Hashimi y col. 2005).

2.6.2. Los glicosomas

Otra de las características distintivas de los trypanosmátidos constituye la presencia de un grupo de organelas conocidas como glicosomas. Los glicosomas son esféricos, rodeados por una única membrana y se encuentran distribuidos al azar por todo el citoplasma del parásito. Si bien comparten algunas funciones metabólicas con los peroxisomas, como la defensa contra especies reactivas del oxígeno y la participación en la biosíntesis de lípidos y la β -oxidación de ácidos grasos, la característica más importante de esta organela reside en que contiene a la mayoría de las enzimas de la vía glicolítica y a otras enzimas del metabolismo de hidratos de carbono (Michels, Bringaud y col. 2006). Esta compartimentalización subcelular del metabolismo, le otorga a los parásitos importantes ventajas adaptativas frente a las diferentes condiciones ambientales a las que son expuestos a lo largo de su ciclo de vida.

2.6.3. Expresión génica

El estudio de la expresión génica en trypanosomátidos demostró la existencia de diversos mecanismos inusuales involucrados en el proceso de transcripción; entre ellos se incluye la transcripción policistrónica, la ausencia de secuencias consenso promotoras para la ARN polimerasa II, el procesamiento del pre-ARNm por *trans-splicing* y la previamente mencionada “edición” de transcritos mitocondriales.

2.6.3.1. Transcripción policistrónica

Con excepción del gen que codifica para la proteína PAP (Poli-A polimerasa) y de otro ORF (del inglés: *Open Reading Frame*; marco abierto de lectura) con función aún desconocida, que pertenece a la familia de las “DEAD-box” helicasas (Mair, Shi y col. 2000), los genes codificantes para proteínas en trypanosomas no poseen intrones de clase II y generalmente se encuentran asociados, formando densas agrupaciones que se denominan “unidades de transcripción policistrónica” (UTP). Las UTP contienen pequeñas regiones intergénicas (150-500 nucleótidos), de muy bajo contenido GC, que separan secuencias codificantes sucesivas (Vanhamme and Pays 1995). No suelen estar conformadas por genes con funciones relacionadas y, si bien se transcriben en unidades policistrónicas largas, los genes individuales pueden presentar un patrón de expresión diferencial, lo cual resalta la falta de un mecanismo regulatorio común (Vanhamme and Pays 1995, Clayton 2002).

2.6.3.2. Ausencia de secuencias consenso promotoras para la ARN polimerasa II

Otra particularidad de los kinetoplastidos es la ausencia aparente de promotores para la ARN polimerasa II, capaces de dirigir la transcripción de las UTP (Vanhamme and Pays 1995). No obstante, se observó que la mayoría de los genes codificantes para proteínas se transcriben por una actividad polimerasa sensible al tratamiento con α -amanitina, típico de la transcripción por ARN polimerasa II (Donelson, Gardner y col. 1999).

En el único caso en el que se encontró transcripción asociada a un promotor para la ARN polimerasa II es para los genes que codifican para el ARN de la secuencia líder (ARN-SL); este transcrito, no codifica para proteína alguna, sino que constituye un exón que se acopla en *trans* a todos los ARNm del parásito (ver más abajo, procesamiento del ARN por *trans-splicing*) (Campbell, Sturm y col. 2000). Los genes que codifican para el ARN-SL se encuentran organizados en un tándem de aproximadamente 200 genes, dentro de un *cluster* único en el genoma de los trypanosomátidos, en donde cada gen del *cluster* contiene su propio promotor.

La ausencia de secuencias consenso promotoras para la ARN polimerasa II, en conjunto con el patrón de expresión diferencial de los genes contenidos en una misma UTP, indica que a diferencia de los eucariotas superiores, el control de la expresión génica en trypanosomas opera principalmente a nivel postranscripcional. En este sentido, los principales mecanismos de regulación involucran la maduración de ARN policistrónicos, la estabilidad de los ARNm y la traducción estadio-específica (Clayton 2002).

2.6.3.3. Procesamiento del ARNm por *trans-splicing*

La maduración de los ARNm en trypanosomas difiere significativamente de la mayoría del resto de los eucariotas, principalmente debido a que los genes codificantes de proteínas se transcriben como ARNs policistrónicos. Salvo por algunos pocos casos en los que se reportó la presencia de intrones y de *cis-splicing* (Mair, Shi y col. 2000), los pre-ARNm sufren un proceso de *trans-splicing* que involucra la adición de un ARN-SL, previamente "capeado", de 39 nucleótidos (Sutton and Boothroyd 1986). Este proceso ocurre a través de una reacción de esterificación en dos pasos, análoga a la del *cis-splicing*, pero como producto intermediario luego del primer paso, se genera una estructura en forma de Y, en lugar del lazo típico del *cis-splicing* (Murphy, Watkins y col. 1986, Liang, Haritan y col. 2003) (Figura 4).

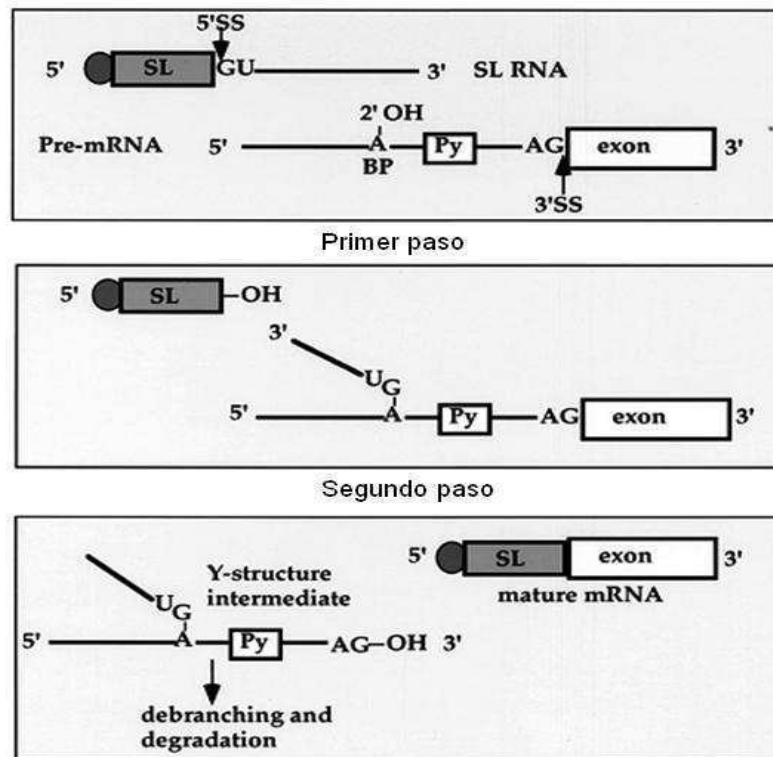


Figura 4. Representación esquemática del proceso de *trans-splicing*. GU: sitio 5' de *splicing* del ARN-SL; AG: sitio 3' de *splicing* del pre-ARNm; BP: sitio de ramificación; Py: tracto de polipirimidinas. Adaptado de Liang, X., y col. (2003).

La reacción de *trans-splicing* depende y se encuentra físicamente acoplada al clivaje y la poliadenilación del extremo 3' (Matthews, Tschudi y col. 1994), que da lugar a la formación de ARNm maduros individuales. Existen dos señales altamente conservadas en el sitio 3' de *splicing* del pre-ARNm en trypanosomas: un dinucleótido aceptor, AG, y un tracto de polipirimidinas asociado río arriba (Matthews, Tschudi y col. 1994); no obstante, tanto la poliadenilación como el *capping* pueden ocurrir en distintas zonas de la región intergénica (Manning-Cela, Gonzalez y col. 2002). En este sentido, dado un mismo gen, las posiciones alternativas generan ARNm con regiones no codificantes de diferentes longitudes, siendo estas variaciones, potencialmente importantes para la regulación de la expresión génica.

3. Búsqueda de nuevos tratamientos contra la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas fue reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida y a través de la "iniciativa de Drogas para

Enfermedades Desatendidas (DNDi)", fundada en el año 2003, impulsó la búsqueda de respuestas a la extrema necesidad de tratamientos seguros, accesibles y eficaces, así como la generación de conciencia sobre la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para esta enfermedad (Chatelain and Ioset 2011). En este contexto, una serie de organismos, incluido el Programa Especial de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales (TDR), plantearon y apoyaron la utilización de estrategias innovadoras para el descubrimiento de nuevas drogas antiparasitarias. Entre los diferentes enfoques adoptados, una de las estrategia apunta al hallazgo *de novo* de compuestos base, sintéticos y naturales, a través de rastreos de alto y mediano rendimiento (Nwaka and Hudson 2006), para los cuales resulta sumamente importante la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

3.1. Las interacciones proteína-proteína como blancos moleculares originales para el desarrollo de una nueva generación de medicamentos

Las interacciones proteína-proteína (IPP) son de suma importancia en los organismos vivos ya que representan el fundamento de todos los procesos celulares. En conjunto, las IPPs de un organismo forman una enorme y compleja red, denominada interactoma, que le permite a una célula "sensar" el medio que la rodea, "comunicarse" con células vecinas y "responder" a señales extracelulares.

La asociación de proteínas en complejos funcionales, así como la disociación, constituyen procesos dinámicos que se encuentran altamente regulados por diferentes mecanismos celulares. Actualmente, se sabe que la modificación de ciertas interacciones entre proteínas puede perturbar una secuencia de reacciones bioquímicas, iniciando procesos patológicos; de esto se desprende que el conocimiento del interactoma de una célula normal puede ser la clave para el diseño de fármacos que podrían impedir el desarrollo de una enfermedad.

En relación a las enfermedades infecciosas, las IPPs que intervienen en funciones esenciales para la viabilidad del patógeno y cuya disociación conduciría a su muerte, surgen como potenciales blancos moleculares para una posible intervención farmacológica debido a que su manipulación ejercería un control sobre eventos celulares de base. En este contexto, la utilización de una IPP como blanco terapéutico presenta una serie de características ventajosas: a diferencia del desarrollo de inhibidores enzimáticos, que se ve obstaculizado por fuertes homologías dentro de una familia de enzimas, la superficie de unión de los complejos binarios de proteínas, que generalmente es distinta, facilita el desarrollo de moléculas con mayor especificidad; además, la interfase de interacción de un complejo

proteína-proteína proporciona múltiples sitios de unión, lo cual posibilita la identificación de numerosas moléculas moduladoras (Thiel, Kaiser y col. 2012). Esta nueva definición de blanco terapéutico implica nuevas estrategias para el descubrimiento de drogas y el origen de una nueva generación de medicamentos, que podría contribuir a la implementación de terapias dirigidas a través del diseño racional de fármacos.

Capítulo I

**Búsqueda de extractos de origen
natural con propiedades
antiparasitarias**

Introducción

1. La tecnología BRET

El método BRET (del inglés: *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*, transferencia de energía bioluminiscente por resonancia) se emplea para el estudio de interacciones entre proteínas y se basa en la transferencia de energía por resonancia de Förster, que ocurre de manera natural en algunas especies marinas, como *Renilla reniformis*. Originalmente, este método fue desarrollado para estudiar interacciones entre proteínas del reloj circadiano en bacterias (Xu, Piston y col. 1999) y luego, se aplicó en células vivas de mamíferos (Angers, Salahpour y col. 2000), plantas (Subramanian, Xu y col. 2004) y levaduras (Gehret, Bajaj y col. 2006). Típicamente, en el ensayo de BRET, una proteína luciferasa constituye el dador de energía, que emite luz en presencia de un sustrato; y un fluoróforo (normalmente una proteína fluorescente), constituye el aceptor, que absorbe luz a una determinada longitud de onda y emite luz a una longitud de onda mayor. Para cumplir con las condiciones de transferencia de energía, el espectro de emisión del dador se debe solapar con el espectro de excitación del aceptor, de manera que la energía emitida por el dador, excite al aceptor (Haugland, Yguerabide y col. 1969, Wu and Brand 1994, Keller, Silvius y col. 1995).

El estudio de IPPs a través de este método implica la fusión, por ingeniería genética, de una de las proteínas de interés al dador de energía y la otra, al aceptor. En caso de que no exista interacción entre las proteínas de interés, solo se detecta la luz correspondiente al producto de la transformación química del sustrato del dador de energía; en cambio, si las proteínas interactúan, ocurre el fenómeno de transferencia de energía por resonancia y por lo tanto, también se detecta una señal de luz fluorescente, que corresponde a la emisión de energía por parte del aceptor (Figura 5 A) (Xu, Piston y col. 1999, Boute, Jockers y col. 2002, Pflieger and Eidne 2006). Particularmente, en el presente trabajo se utilizó una proteína luciferasa de *Renilla* (Rluc), como dador de energía y la variante mejorada de la proteína fluorescente amarilla (EYFP), como aceptor. La máxima emisión de energía por parte de Rluc se observa a 480 nm, longitud de onda apropiada para la excitación de EYFP, quien subsecuentemente emite luz fluorescente a 530 nm (Figura 5 B) (Bacart, Corbel y col. 2008).

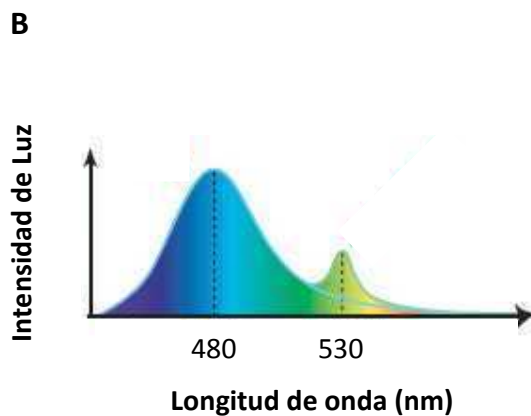
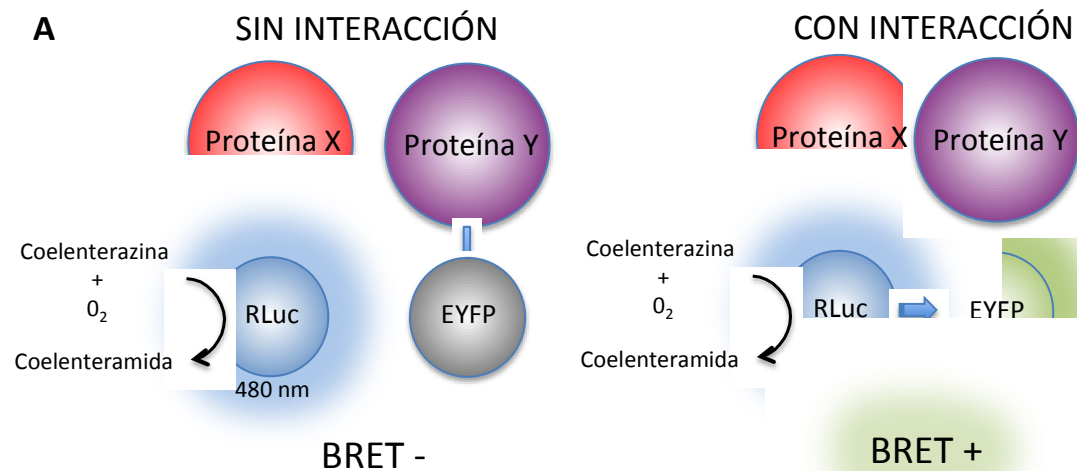


Figura 5. (A) Representación esquemática del ensayo de BRET. Las proteínas de interés “X” e “Y” se fusionan al dador (RLuc) y al aceptor (EYFP) de energía. Luego de la incubación con el sustrato de RLuc (Coelenterazina), la señal de transferencia de energía se detecta cuando se produce la interacción entre las proteínas en estudio. **(B) Propiedades espectrales del dador y aceptor de energía.** Para el ensayo de BRET el espectro de emisión del dador de energía se debe solapar con el espectro de absorción del aceptor. Adaptado de Bacart, J., y col. (2008).

1.1. Parámetros que afectan la señal de BRET

Existen al menos tres parámetros que determinan la intensidad de la señal de BRET. Uno de ellos es la distancia entre las proteínas de fusión; se demostró que la transferencia de energía disminuye progresivamente cuando la distancia entre el dador y el aceptor aumenta de 1 a 10 nm, siendo 10 nm la distancia máxima para que ocurra la transferencia de energía de Förster (Wu and Brand 1994, Kasprzak 2007). Otro parámetro, es la orientación relativa del par dador-aceptor debido a la naturaleza dipolo-dipolo del mecanismo de transferencia de energía de resonancia (Clegg, Murchie y col. 1993, Kasprzak 2007); en este sentido, la ausencia de señal de BRET entre dos proteínas no necesariamente significa que no interactúen entre sí. Finalmente, debido a que la señal de BRET se calcula como el cociente

entre la emisión del aceptor de energía y la emisión del dador, otro de los parámetros que afecta la señal es la proporción de estas moléculas. La dependencia de la señal de BRET en función de este parámetro se refleja en curvas de saturación del dador de energía, donde se coexpresa o coincuba una cantidad fija del dador, con cantidades crecientes del aceptor. En estas curvas, cuando una interacción es específica, la señal de BRET aumenta de manera hiperbólica conforme aumenta la cantidad de moléculas del aceptor, y alcanza una meseta que representa la saturación completa de los sitios del dador de energía con moléculas del aceptor. Por otra parte, cuando las proteínas no interactúan entre sí, la señal tiende a aumentar linealmente con la concentración del aceptor de energía como consecuencia de posibles interacciones estocásticas, dando lugar a una señal detectable, generalmente débil, pero no específica (Figura 6) (Mercier, Salahpour y col. 2002, Couturier and Jockers 2003, Ayoub, Levoye y col. 2004, Ramsay, Carr y col. 2004).

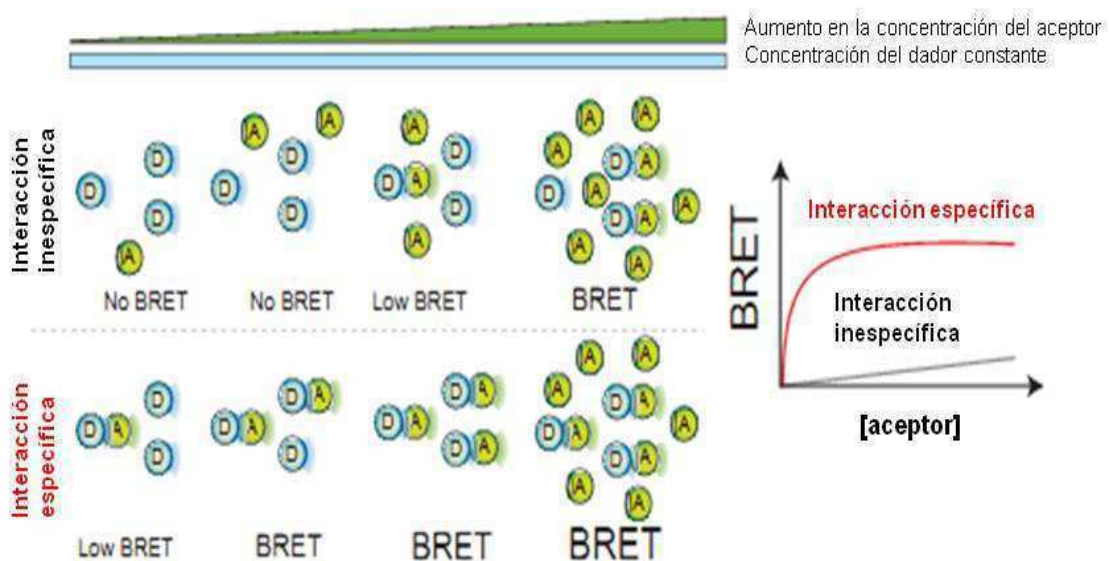


Figura 6. Representación esquemática del efecto de la relación aceptor/dador sobre la intensidad de la señal de BRET. Curvas de saturación del dador de energía para interacciones específicas e inespecíficas. D: dador de energía; A: aceptor de energía. Adaptado de Bacart, J., y col. (2008).

2. El ensayo de BRET en rastreos de drogas

A lo largo de los años, numerosas tecnologías fueron desarrolladas con el fin de llevar a cabo ensayos de rastreo de drogas; para aumentar el rendimiento, se prestó especial

atención a la miniaturización de los volúmenes de muestra y a la obtención de lecturas rápidas y simples. En este sentido, el rastreo de principios activos mediante un ensayo de transferencia de energía, como el ensayo de BRET, constituye una herramienta altamente promisorio ya que no solo cumple con estos criterios, sino que además, es una técnica económica y presenta una elevada sensibilidad (Bacart, Corbel y col. 2008). Más aún, debido a que el ensayo de BRET se basa en la expresión de proteínas de fusión generadas por ingeniería genética, una de las ventajas de esta metodología reside en que posibilita el monitoreo de IPPs directamente en células vivas (Bacart, Corbel y col. 2008). En particular, este ensayo resulta muy adecuado para el rastreo de moléculas inhibitoras debido a que la señal de BRET depende de la relación aceptor/dador y por lo tanto, de la proporción de pares de interacción y de moléculas libres; en este contexto, un compuesto capaz de inhibir una IPP no solo reduce la cantidad de pares de interacción acoplados, sino que además, aumenta la cantidad de moléculas libres del dador de energía, provocando consecuentemente, una disminución de la señal de BRET mayor, a que si solamente se redujeran los pares de interacción (Figura 7 A) (Couturier and Deprez 2012).

Si bien la utilización del ensayo de BRET en el rastreo de inhibidores de IPPs presenta un gran potencial, solo unos pocos estudios fueron publicados recientemente en esta área: en un trabajo previo se desarrolló un ensayo basado en esta metodología para la detección de interacciones toxina-antitoxina en *E. coli* que se propuso para la identificación de potenciales agentes antimicrobianos (Nieto, Pellicer y col. 2006); en otro estudio, se utilizó esta técnica para el rastreo de una biblioteca de pequeñas moléculas y se encontró una con capacidad de interrumpir la interacción entre las proteínas CDK5 y p25 en levaduras (Corbel, Wang y col. 2011); de esta misma manera, se detectó una variedad de compuestos capaces de inhibir la interacción entre la proteína asociada a microtúbulos, Tau, y la tirosina kinasa, Fyn (Cochran, Diggs y col. 2014). Asimismo, se utilizó el ensayo de BRET para validar la capacidad del compuesto Nutlin-3 de interrumpir la interacción entre las proteínas p53 y HDM2 (Mazars and Fahraeus 2010).

Por otra parte, este método permite rastrear otro tipo de compuestos moduladores, que si bien no promoverían una inhibición de una IPP, podrían dar lugar a un cambio en la función biológica (Figura 7 B). En relación a esto, trabajos previos utilizaron con éxito el ensayo de BRET para demostrar la inducción de cambios conformacionales en receptores tras la unión a sus ligandos, y el consecuente efecto biológico (Boute, Pernet y col. 2001, Couturier and Jockers 2003, Blanquart, Gonzalez-Yanes y col. 2006, Gales, Van Durm y col. 2006, Audet and Pineyro 2011).

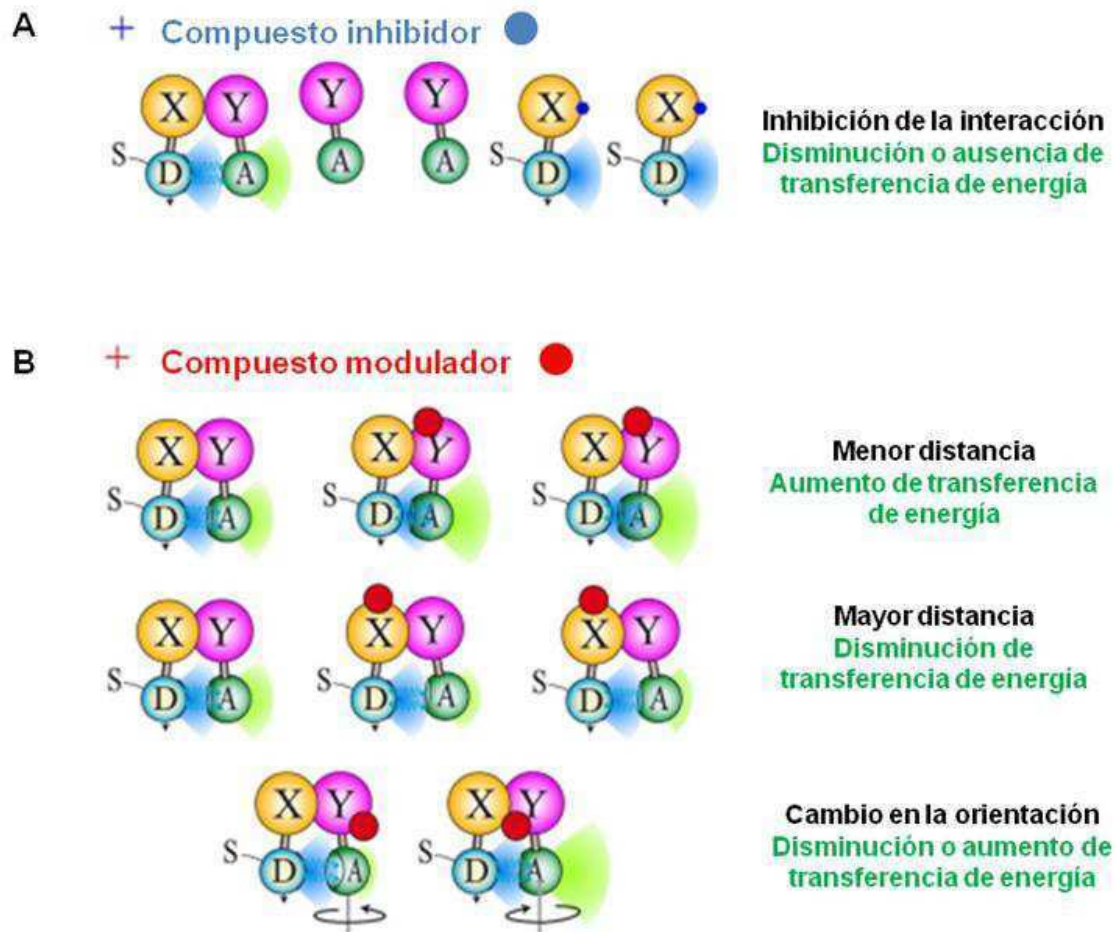


Figura 7. Posibles resultados de un rastreo de principios activos mediante un ensayo de BRET. (A) Efecto de un compuesto inhibidor sobre una IPP. **(B)** Efecto de otros compuestos moduladores sobre una IPP. X e Y: proteínas de la interacción. D: dador de energía. A: aceptor de energía. S: sustrato. Adaptado de Couturier, C. y Deprez, B. (2012).

2.1. Consideraciones para el ensayo de BRET en un rastreo de inhibidores de IPPs

Es importante tener en cuenta ciertas consideraciones al utilizar un ensayo de BRET para un rastreo de inhibidores de IPPs: en primer lugar, la señal de BRET tiene que ser lo suficientemente elevada como para ser detectada por el equipo de medición; en este sentido, como se desprende de la curva de saturación del dador de energía, la máxima señal de BRET depende de la relación entre las moléculas del dador que interactúan con moléculas del aceptor vs. las moléculas libres del dador. De hecho, en una relación de equimolaridad, si todos los dadores interactuasen con los aceptores se debería alcanzar un máximo de señal de BRET. Sin embargo, este no suele ser el caso y las moléculas libres del dador de energía tienden a disminuir la señal máxima (Figura 8 A). Por lo tanto, a fin de

obtener una señal de BRET elevada es recomendable aumentar la cantidad de moléculas del aceptor de energía. No obstante, para garantizar la detección de un inhibidor, también hay que tener en cuenta que un exceso de moléculas del aceptor de energía podría titular el efecto, especialmente si el principio activo no se encuentra en una concentración equivalente a la del aceptor. De esta manera, las condiciones óptimas para un rastreo de inhibidores corresponden a una ventana ideal, contenida dentro del rango dinámico de la curva de saturación del dador de energía donde la señal de BRET es detectable, pero la cantidad de moléculas del aceptor no satura los sitios del dador (Figura 8 B) (Couturier and Deprez 2012).

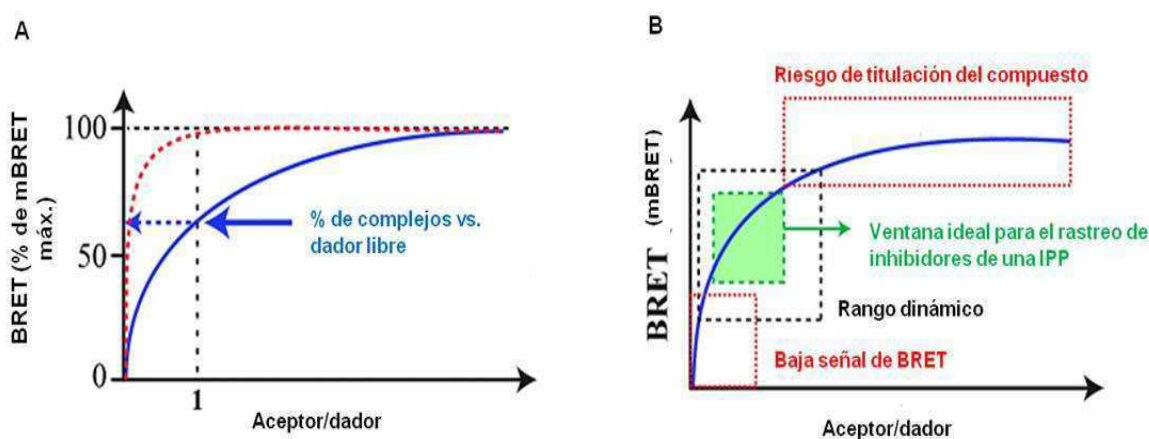


Figura 8. Curva de saturación del dador de energía. (A) En rojo: curva teórica si el 100% del dador y el aceptor interactúan en una relación molar 1:1; en azul: curva estándar que muestra un menor porcentaje de complejos dador-aceptor. (B) Curva de saturación de energía para establecer las condiciones de un rastreo de inhibidores de una IPP. Puntos rojos: zonas de la curva para evitar; puntos negros: rango dinámico; puntos verdes: ventana ideal para el rastreo. Adaptado de Couturier, C. y Deprez, B. (2012).

Otras consideraciones a tener en cuenta son las siguientes: (1) la señal de BRET debe ser corregida con la señal (medida a 480 y 530 nm) que corresponde al dador de energía, en ausencia del aceptor y que representa la señal de fondo que se genera como consecuencia del solapamiento entre el espectro de emisión del dador y el de absorción del aceptor; (2) la presencia de moléculas coloreadas o compuestos fluorescentes, que interfieren con las propiedades de absorción del ensayo, así como moléculas capaces de unirse a Rluc, EYFP o a la región *linker* de la proteínas de fusión, pueden generar resultados falsos positivos o falsos negativos y por lo tanto, es importante realizar controles pertinentes (Bacart, Corbel y col. 2008).

3. Hipótesis y objetivo general

En la actualidad, el tratamiento de la Enfermedad de Chagas se basa en la quimioterapia con Benznidazol o Nifurtimox, drogas que presentan elevada toxicidad y baja efectividad, sobre todo en la fase crónica de la enfermedad (Ministerio de Salud de la Nación 2012). Ante la urgencia por encontrar nuevos agentes antiparasitarios y bajo la premisa de que la inhibición de interacciones involucradas en procesos metabólicos esenciales podría afectar la viabilidad del parásito, nuestro objetivo principal consistió en la búsqueda de extractos de origen natural capaces de inhibir interacciones entre proteínas de *T. cruzi*, a fin de que puedan ser utilizados para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Específicamente, se utilizó el ensayo de BRET como base para el rastreo y se consideraron como blanco interacciones entre proteínas P ribosomales y entre proteínas que intervienen en el procesamiento del ARNm en *T. cruzi* (Tabla 2). Las interacciones fueron identificadas y caracterizadas en trabajos previos y cumplen con dos requerimientos fundamentales: (1) son esenciales para el parásito y (2) presentan características exclusivas respecto de su contraparte en humanos.

Par de interacción	Número de acceso (TritypDB)	Longitud (aminoácidos)	Identidad respecto a la proteína humana	Complejo proteico
P0 P1 α	TcCLB.508355.260 TcCLB.510823.70	323 109	41 % 46 %	Complejo de proteínas P de la protuberancia ribosomal
P0 P1 β	TcCLB.508355.260 TcCLB.510267.20	323 115	41 % 39 %	Complejo de proteínas P de la protuberancia ribosomal
P0 P2 α	TcCLB.508355.260 TcCLB.505977.26	323 112	41 % 34 %	Complejo de proteínas P de la protuberancia ribosomal
P0 P2 β	TcCLB.508355.260 TcCLB.509165.40	323 107	41 % 32 %	Complejo de proteínas P de la protuberancia ribosomal
P1 α P2 β	TcCLB.510823.70 TcCLB.509165.40	109 107	46 % 32 %	Complejo de proteínas P de la protuberancia ribosomal
P2 α P2 β	TcCLB.505977.26 TcCLB.509165.40	112 107	34 % 32 %	Complejo de proteínas P de la protuberancia ribosomal
SF1 U2AF65	TcCLB.508717.40 TcCLB.510265.40	267 841	27 % 22 %	Complejo temprano E de <i>trans-splicing</i>
FIP1 CpsF30	TcCLB.510351.80 TcCLB.510219.30	287 271	44 % 47 %	Complejo de poliadenilación
p14 Sf3b155	TcCLB.510105.33 TcCLB.508827.100	117 1102	42 % 33 %	Complejo A de <i>trans-splicing</i>
Mago Y14	TcCLB.506945.200 TcCLB.507515.40	165 158	53 % 29 %	Complejo de juntura exónica

Tabla 2. Interacciones entre proteínas de *T. cruzi* consideradas como blanco para el rastreo de inhibidores.

4. Generalidades de las IPPs consideradas para el rastreo de inhibidores

En eucariotas, la subunidad mayor del ribosoma posee una larga protuberancia compuesta por proteínas P; esta protuberancia o tallo ribosomal interactúa con el factor de elongación EF-2 y posee un rol fundamental en el proceso de translocación del ribosoma durante el paso de elongación en la síntesis proteica (Liljas 1991). En general, la proteína P0 constituye el componente central de la protuberancia y se encuentra flanqueada por las proteínas P1 y P2. La cantidad de proteínas P varía según la especie (Liljas 1991); en *T. cruzi*, el tallo ribosomal está formado por 5 proteínas P: TcP0, TcP1 α , TcP1 β , TcP2 α y TcP2 β (Juri Ayub, Smulski y col. 2005), que presentan características particulares tales como un dominio altamente inusual en el extremo C-terminal de P0 (Vazquez, Schijman y col. 1992) y una extensión acídica N-terminal en P1 β . Asimismo, las proteínas P presentan un patrón de interacciones proteína-proteína particular de *T. cruzi* (Tabla 2) (Juri Ayub, Smulski y col. 2005, Smulski, Longhi y col. 2011).

El estudio de los complejos de proteínas que intervienen en el procesamiento del ARNm en trypanosomas es de especial interés dado que la maduración de ARN policistrónicos claramente se desvía del mismo proceso en el resto de los eucariotas (Liang, Haritan y col. 2003). Como sucede en otros eucariotas, se demostró en *T. cruzi* que los factores de *splicing* SF1 y U2AF65, esenciales para el ensamblado inicial del spliceosoma, también interactúan entre sí (Vazquez, Mualem y col. 2009). En humanos, el motivo SRW, presente en el extremo N-terminal del factor SF1, es el responsable de la interacción con el dominio RRMIII (del inglés: *RNA-Recognition Motif*; motivo de reconocimiento del ARN) de U2AF65 (Selenko, Gregorovic y col. 2003). El residuo aromático triptofano (W) de SF1 establece una interacción unidireccional con el bolsillo hidrofóbico presente en el dominio RRMIII de U2AF65; más aún, este residuo está acompañado por una cola de aminoácidos básicos que provee interacciones electrostáticas dentro del bolsillo, estabilizando la unión (Selenko, Gregorovic y col. 2003). En *T. cruzi*, esta característica se encuentra parcialmente conservada debido a que SF1 presenta la región básica interrumpida por residuos prolina. Además, en trypanosomátidos, SF1 carece de la secuencia C-terminal presente en mamíferos, lo cual incrementa su divergencia respecto de estos organismos (Vazquez, Mualem y col. 2009). Por otra parte, el factor U2AF65 de trypanosomas difiere altamente de sus ortólogos en el resto de los eucariotas. Esta proteína carece de los característicos tres dominios RRM completos, organizados en tándem; por el contrario, presenta un dominio RRMI degenerado, seguido de un RRMII de estructura típica y un nuevo tipo de dominio RRM, denominado pRRMIII, que se encuentra interrumpido por una secuencia aminoacídica,

estructuralmente reconocida como NORS, a través de la cual se fortalece la unión a la proteína SF1 trypanosomal (Vazquez, Mualem y col. 2009).

En *T. cruzi*, las proteínas FIP1 (del inglés: *Factor Interacting with PAP*) y CpsF30 (del inglés: *Cleavage/polyadenylation specificity Factor*), del complejo de poliadenilación, son capaces de interactuar entre sí. Si bien en trypanosomas y humanos existe una interfase de interacción compartida, con residuos conservados, la contribución de varios de estos aminoácidos a la superficie de contacto pareciera ser bastante diferente (Bercovich, Levin y col. 2009). Además, mientras que TcCpsF30 presenta una elevada similitud con sus ortólogos, con la misma organización en la estructura de sus múltiples dominios dedo de zinc; en contraste con otras proteínas FIP1, la versión trypanosomal de esta proteína es más corta y presenta en el extremo C-terminal un motivo dedo de zinc, del tipo CCCH, seguido de una región rica en glutaminas, ausente en el resto de los eucariotas (Bercovich, Levin y col. 2009). En base a estas diferencias y al hecho de que ambas proteínas resultaron ser esenciales para la viabilidad celular de trypanosomas [30, 31], el par de interacción FIP1/CpsF30 fue postulado como blanco putativo de drogas antiparasitarias (Bercovich, Levin y col. 2009).

Los factores del complejo A de *trans-splicing*, p14 y Sf3b155, son componentes esenciales del spliceosoma y su función es crucial en el reconocimiento de la adenosina del sitio de ramificación en la reacción de *splicing* (Brosi, Hauri y col. 1993). En *T. cruzi*, estas proteínas interactúan fuertemente entre sí (Avila, Bercovich y col. 2007). TcP14 comparte un 42 % de identidad con la proteína ortóloga humana; esta homología se encuentra restringida a los 77 residuos que conforman el único dominio RRM, a través del cual se produce la interacción con Sf3b155. Por otra parte, TcSf3b155 comparte un 33 % de identidad y un 51 % de residuos conservados con la proteína ortóloga en humanos; sin embargo, la región N-terminal de la proteína en trypanosomas es menos conservada (27 %) y 161 aminoácidos más corta que esa misma región en su contraparte humana (Avila, Bercovich y col. 2007).

El complejo de juntura de exones (EJC) es un complejo proteico que se forma sobre el pre-ARNm y, en todas las especies en las que fue descrito, posee un papel central en la modulación de varios procesos entre los que se encuentra la exportación de los ARNm maduros del núcleo (Tange, Nott y col. 2004). Los primeros componentes del EJC descritos en trypanosomas corresponden a la proteína Mago, altamente conservada entre distintas especies, y a Y14, una proteína divergente; ambas, capaces de interactuar entre sí (Bercovich, Levin y col. 2009). En trypanosomas, Mago presenta un porcentaje de identidad de secuencia mayor al 50 %, respecto de las proteínas Mago ya caracterizadas; TcY14, es

más pequeña que en humanos, contiene un dominio RRM con algunos residuos clave conservados, mientras que conserva pocos aminoácidos en los extremos N- y C-terminales. Además, por medio de experimentos de silenciamiento por ARN de interferencia se demostró que Y14 es esencial para el crecimiento normal de *T. brucei* (Bercovich, Levin y col. 2009).

Como se mencionó anteriormente, estas interacciones constituyen blancos sumamente atractivos para incluir en un rastreo de inhibidores debido a que participan en procesos metabólicos esenciales para la viabilidad de *T. cruzi* y presentan diferencias con su contraparte humana.

Resultados

1. Generación de proteínas de fusión dadoras y receptoras de energía para el ensayo de BRET

Las secuencias codificantes para las proteínas de las interacciones consideradas como blanco para el rastreo (Tabla 2) fueron amplificadas a partir de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa CL Brener, y clonadas en un vector de entrada del sistema Gateway® (pCR®8/GW/TOPO®TA). Para las proteínas P1 α , P1 β , P2 α , P2 β , SF1, FIP1, CpsF30, p14, Mago e Y14, se clonó la secuencia codificante completa; en tanto que para P0, U2AF65 y Sf3b155, se clonaron las secuencias correspondientes a los dominios de interacción, a fin de facilitar su expresión (P0: residuos 212-323; U2AF65: residuos 614-841; Sf3b155: residuos 1-270) (Juri Ayub, Smulski y col. 2005, Avila, Bercovich y col. 2007, Vazquez, Mualem y col. 2009).

Mediante una reacción de recombinación LR, cada ORF fue transferido a 4 plásmidos destino para el ensayo de BRET (provistos por el Dr. Nelson Dusetti, del *Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille*, Francia), resultando en la fusión al dador (RLuc) y al receptor (EYFP) de energía, en orientación N-, y C-terminal (Figura 9).

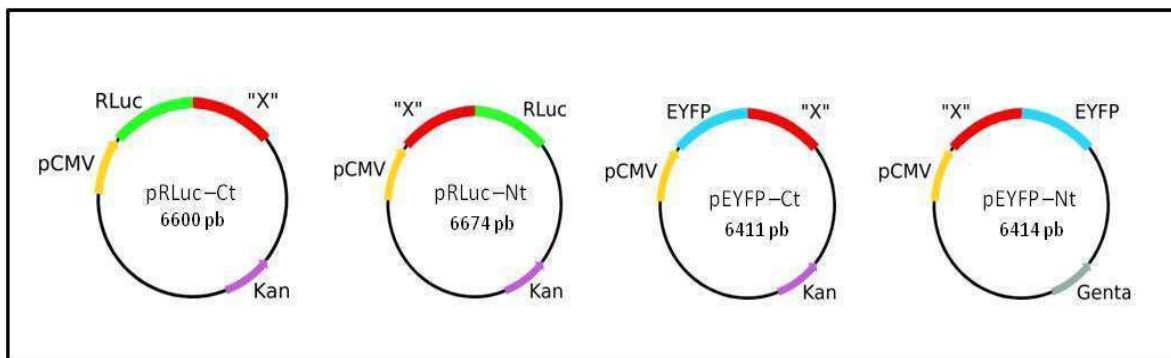


Figura 9. Dibujo esquemático de los plásmidos destino del ensayo de BRET. Como resultado de una reacción de recombinación LR, la proteína "X" fue subclonada a 4 plásmidos destino, obteniendo su fusión a RLuc y a EYFP, en orientación N- y C-terminal.

2. Estudio de IPPs de *T. cruzi* mediante el ensayo de BRET

Se analizaron las IPPs consideradas como blanco para el rastreo (Tabla 2) por medio de ensayos de BRET a fin de establecer la señal de interacción. Los ensayos se realizaron sobre células vivas y lisados celulares, y para cada par de interacción se realizó una curva

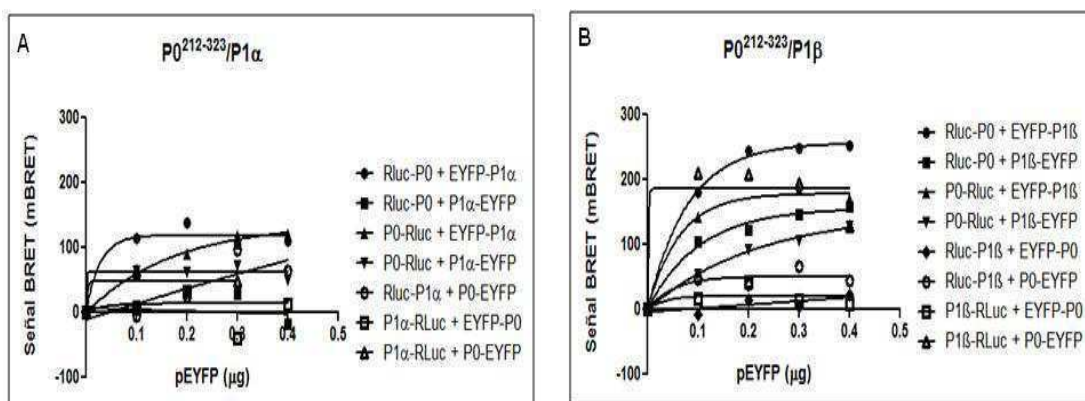
de saturación del dador de energía. Considerando que cada proteína fue clonada en fusión a Rluc y a EYFP, en orientación N- y C-terminal, por cada par de interacción se evaluaron las 8 combinaciones posibles de pares de proteínas de fusión, para los ensayos en células vivas y algunas combinaciones, para los ensayos en lisados celulares.

2.1. Ensayo de BRET en células vivas

2.1.1. Interacciones entre proteínas P ribosomales

Se realizaron curvas de saturación del dador de energía para las 6 interacciones entre proteínas P de la protuberancia ribosomal. Brevemente, para cada combinación de proteínas de fusión, células HEK 293T fueron cotransfectadas con una cantidad constante del plásmido que contenía al dador de energía y cantidades crecientes del plásmido que contenía al aceptor. Luego de 48 horas se agregó coelenterazina h y se midió emisión de luminiscencia y fluorescencia.

Todas las interacciones presentaron una curva de saturación del dador de energía hiperbólica, en alguna de las combinaciones de proteínas de fusión (Figura 10). Como se mencionó previamente, una curva hiperbólica es típica de una interacción específica (Bacart, Corbel y col. 2008).



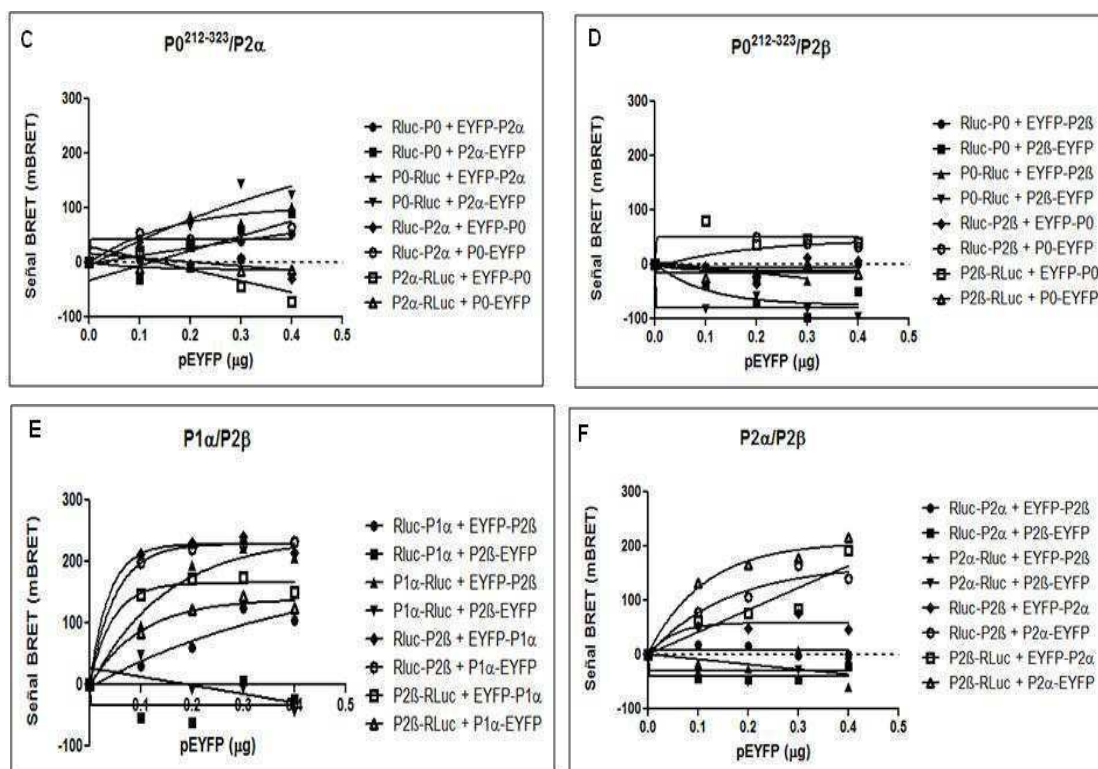


Figura 10. Curvas de saturación del dador de energía en células vivas para interacciones entre proteínas P del ribosoma. Células HEK 293T fueron cotransfectadas con 0,4 μg del plásmido que contenía al dador de energía y cantidades crecientes del plásmido que contenía al aceptor (0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 μg). Células transfectadas solo con el plásmido que contenía al dador fueron utilizadas para determinar la señal de fondo. Luego de 48 horas, se inició la transferencia de energía por adición de coelenterazina a $5 \mu\text{M}$. Se midió emisión a 485 y 530 nm. Se graficaron curvas de saturación del dador de energía para células que coexpresaban Rluc y EYFP fusionadas a las siguientes proteínas: (A) $\text{P0}^{212-323}$ y $\text{P1}\alpha$. (B) $\text{P0}^{212-323}$ y $\text{P1}\beta$. (C) $\text{P0}^{212-323}$ y $\text{P2}\alpha$. (D) $\text{P0}^{212-323}$ y $\text{P2}\beta$. (E) $\text{P1}\alpha$ y $\text{P2}\beta$. (F) $\text{P2}\alpha$ y $\text{P2}\beta$. En cada panel se muestra el resultado de todas las combinaciones de proteínas de fusión del par de interacción evaluado.

Las combinaciones de proteínas de fusión que presentaron una señal de interacción específica (Figura 10) y por lo tanto, se consideraron positivas para el ensayo de BRET son las siguientes:

(A) Par $\text{P0}^{212-323}/\text{P1}\alpha$: $\text{Rluc-P0}^{212-323}/\text{EYFP-P1}\alpha$, $\text{P0}^{212-323}\text{-Rluc}/\text{EYFP-P1}\alpha$, $\text{P0}^{212-323}\text{-Rluc}/\text{P1}\alpha\text{-EYFP}$ y $\text{P1}\alpha\text{-Rluc}/\text{P0}^{212-323}\text{-EYFP}$.

(B) Par $\text{P0}^{212-323}/\text{P1}\beta$: $\text{Rluc-P0}^{212-323}/\text{EYFP-P1}\beta$, $\text{Rluc-P0}^{212-323}/\text{P1}\beta\text{-EYFP}$, $\text{P0}^{212-323}\text{-Rluc}/\text{EYFP-P1}\beta$, $\text{P0}^{212-323}\text{-Rluc}/\text{P1}\beta\text{-EYFP}$, $\text{Rluc-P1}\beta/\text{P0}^{212-323}\text{-EYFP}$ y $\text{P1}\beta\text{-Rluc}/\text{P0}^{212-323}\text{-EYFP}$.

(C) Par $\text{P0}^{212-323}/\text{P2}\alpha$: $\text{P0}^{212-323}\text{-Rluc}/\text{EYFP-P2}\alpha$ y $\text{Rluc-P2}\alpha/\text{P0}^{212-323}\text{-EYFP}$.

(D) Par $P0^{212-323}/P2\beta$: Rluc-P2 β / $P0^{212-323}$ -EYFP y P2 β -Rluc/EYFP- $P0^{212-323}$.

(E) Par P1 α /P2 β : Rluc-P1 α /EYFP-P2 β , P1 α -Rluc/EYFP-P2 β , Rluc-P2 β /EYFP-P1 α , Rluc-P2 β /P1 α -EYFP, P2 β -Rluc/EYFP-P1 α y P2 β -Rluc/P1 α -EYFP.

(F) Par P2 α /P2 β : Rluc-P2 β /EYFP-P2 α , Rluc-P2 β /P2 α -EYFP y P2 β -Rluc/P2 α -EYFP.

Se descartaron las combinaciones de proteínas cuya señal de BRET resultó negativa y también las combinaciones: Rluc-P1 α / $P0^{212-323}$ -EYFP, $P0^{212-323}$ -Rluc/P2 α -EYFP y P2 β -Rluc/EYFP-P2 α (Figura 10 A, C y F, respectivamente), debido a que la señal de BRET aumentó linealmente en función del aceptor de energía. Asimismo, se descartaron aquellas combinaciones de proteínas cuya señal máxima resultó inferior a 50 mBRET.

2.1.2. Interacciones entre proteínas del procesamiento del ARNm

Se realizaron curvas de saturación del dador de energía para interacciones entre proteínas que participan en el procesamiento del ARNm. Las 4 interacciones evaluadas presentaron combinaciones de proteínas de fusión con señal de interacción específica (Figura 11):

(A) Par SF1/U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹: Rluc-U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹/SF1-EYFP y U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-Rluc/SF1-EYFP.

(B) Par FIP1/CspF30: Rluc-FIP1/EYFP-Cpsf30, Rluc-CpsF30/EYFP-FIP1 y CpsF30-Rluc/EYFP-FIP1.

(C) Par p14/Sf3b155¹⁻²⁷⁰: Rluc-p14/EYFP-Sf3b155¹⁻²⁷⁰, Rluc-p14/Sf3b155¹⁻²⁷⁰-EYFP, p14-Rluc/EYFP-Sf3b155¹⁻²⁷⁰, Rluc-p14/Sf3b155¹²⁷⁰-EYFP, Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/EYFP-p14 y Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP.

(D) Par Mago/Y14: Rluc-Mago/EYFP-Y14, Mago-Rluc/EYFP-Y14, Rluc-Y14/EYFP-Mago, Rluc-Y14/Mago-EYFP, Y14-Rluc/EYFP-Mago e Y14-Rluc/Mago-EYFP.

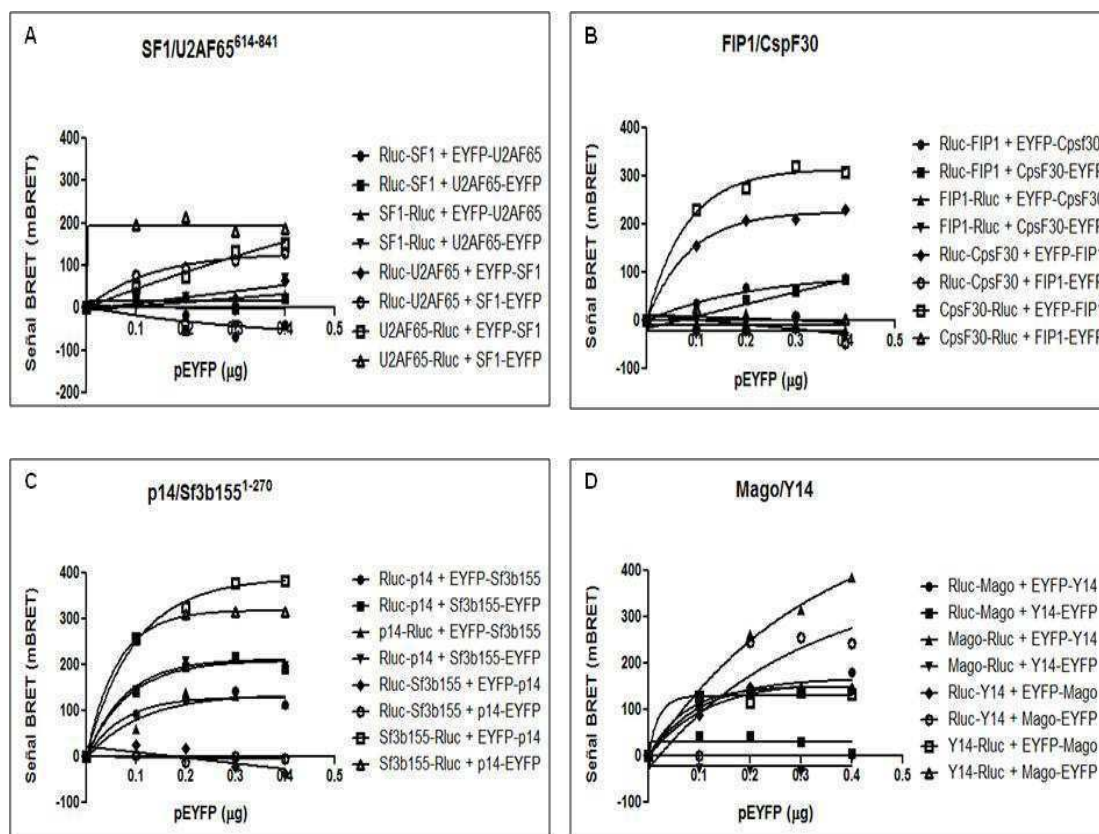


Figura 11. Curvas de saturación del dador de energía en células vivas para interacciones entre proteínas que participan en el procesamiento del ARNm. Células HEK 293T fueron cotransfectadas con 0,4 μg del plásmido que contenía al dador de energía y cantidades crecientes del plásmido que contenía al aceptor (0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 μg). Células transfectadas solo con el plásmido que contenía al dador fueron utilizadas para determinar la señal de fondo. Luego de 48 horas se agregó coelenterazina a 5 μM y se midió emisión a 485 y 530 nm. Se graficaron curvas de saturación del dador de energía para células que coexpresaban Rluc y EYFP fusionadas a las siguientes proteínas: **(A)** SF1 y U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹. **(B)** FIP1 y CspF30. **(C)** p14 y Sf3b155¹⁻²⁷⁰. **(D)** Mago y Y14. En cada panel se muestra el resultado de todas las combinaciones de proteínas de fusión del par de interacción evaluado.

2.2. Ensayo de BRET en lisados celulares

Se realizaron curvas de saturación del dador de energía para los distintos pares de interacción, utilizando lisados celulares. Para ello, se transfectaron células HEK 293T con los plásmidos destino de BRET y luego de 48 horas se lisaron mecánicamente. Para las curvas de saturación propiamente dichas, se coincubó una cantidad constante de un lisado que contenía al dador de energía, con cantidades crecientes de un lisado que contenía al aceptor. Para las curvas, se consideraron experiencias previas del laboratorio del Dr. Dusetti, donde se estableció que la cantidad óptima del dador de energía es la correspondiente a 150.000 UA de actividad luciferasa; para determinar la concentración de lisado

correspondiente a esa actividad, para cada lisado que contenía al dador se realizó una curva de actividad luciferasa en función de las proteínas totales.

A modo de ejemplo representativo, se muestra una curva de actividad luciferasa para un lisado que contenía a la proteína dadora, Rluc-U2AF65¹⁻²⁷⁰. En este caso, según se desprende del ajuste a una función lineal, 3,76 μ g del lisado corresponden a 150.000 UA de actividad luciferasa (Figura 12).

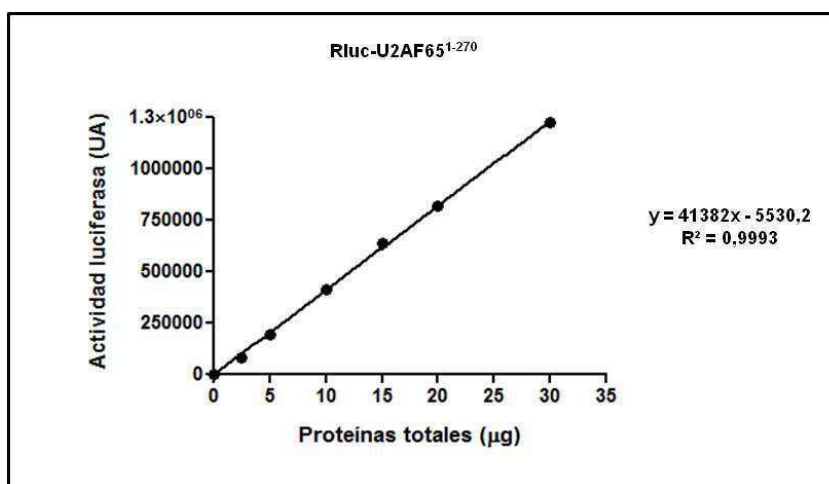


Figura 12. Curva de actividad luciferasa para la proteína de fusión Rluc-U2AF65¹⁻²⁷⁰. Se incubaron por 30 min. cantidades crecientes de un lisado que contenía a la proteína Rluc-U2AF65¹⁻²⁷⁰ (0, 2,5, 5, 10, 15, 20 y 30 μ g). Se agregó coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 485 nm. Se informa la ecuación y el R^2 para el ajuste de los datos a una función lineal.

2.2.1 Interacciones entre proteínas P ribosomales

Para las interacciones P0²¹²⁻³²³/P1 α y P0²¹²⁻³²³/P1 β las curvas de saturación del dador de energía resultaron positivas para todas las combinaciones de proteínas de fusión evaluadas (Figura 13 A y B, respectivamente). Asimismo, resultaron positivas las combinaciones Rluc-P2 α /P0²¹²⁻³²³-EYFP (panel C), Rluc-P2 β /EYFP-P1 α y Rluc-P2 β /P1 α -EYFP (panel E).

Notablemente, para la interacción P0²¹²⁻³²³/P1 α , las combinaciones Rluc-P0²¹²⁻³²³/P1 α -EYFP y Rluc-P1 α /P0²¹²⁻³²³-EYFP no presentaron señal de interacción específica en células vivas, pero sí en lisados celulares (Figura 10 A vs. 13 A, respectivamente); lo inverso sucedió con la interacción P0²¹²⁻³²³/P2 β , en la combinación Rluc-P2 β /P0²¹²⁻³²³-EYFP (Figura 10 D vs. 13 D) y con la interacción P1 α /P2 β , en las combinaciones P2 β -Rluc/EYFP-P1 α y P2 β -Rluc/P1 α -EYFP (Figura 10 E vs. 13 E). Estas observaciones sugieren que no sería posible

establecer una correlación entre los resultados del ensayo de BRET en células vivas y en lisados celulares.

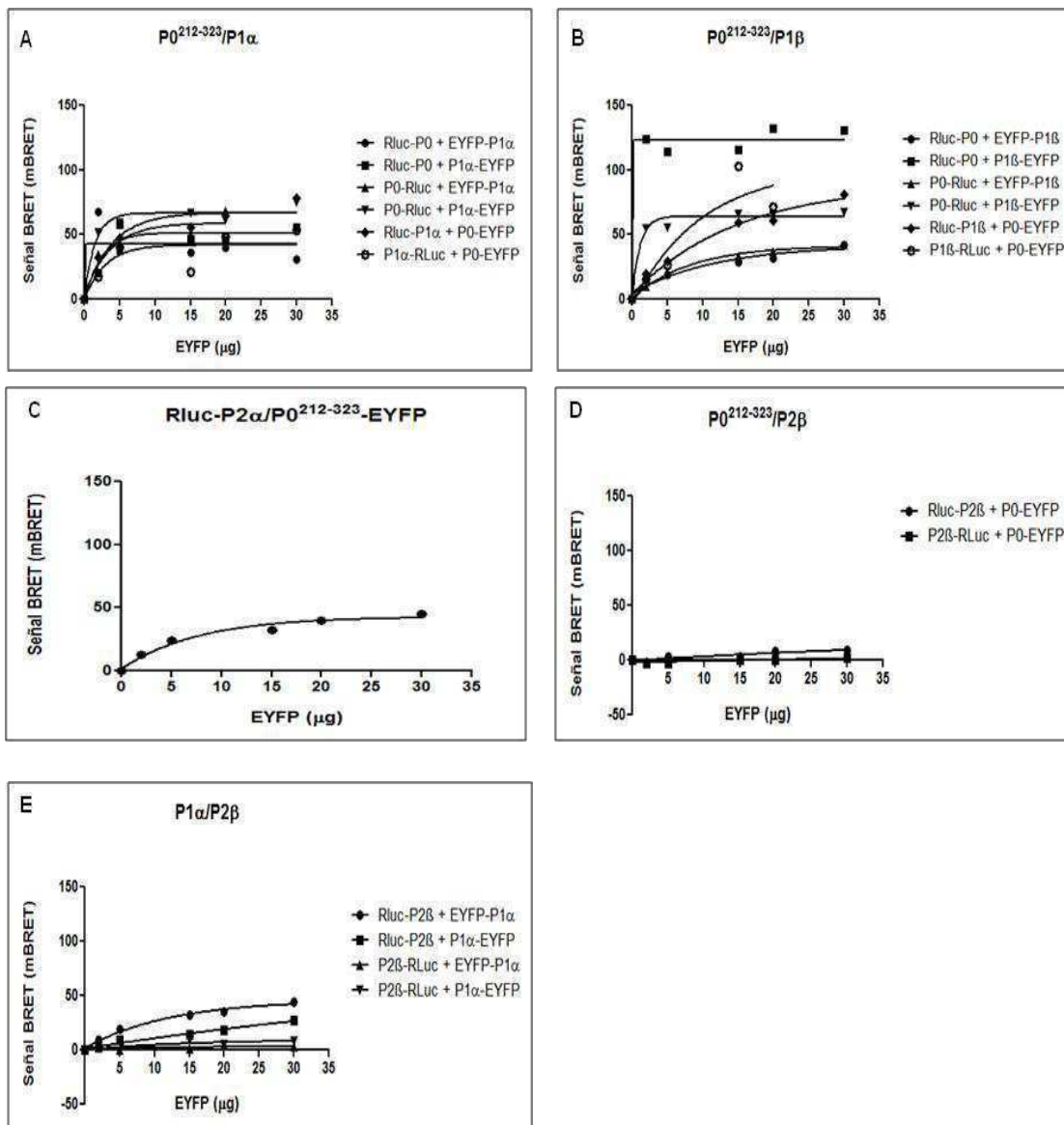


Figura 13. Curvas de saturación del dador de energía con lisados celulares para interacciones entre proteínas P del ribosoma. Se incubaron 150.000 UA de actividad luciferasa con cantidades crecientes de proteínas de un lisado que contenía al aceptor de energía (5, 15, 20 y 30 µg) durante 30 min. Para determinar la señal de fondo, 150.000 UA de actividad luciferasa se incubaron en ausencia del lisado que contenía al aceptor. Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 485 y 530 nm. **(A)** Par $P0^{212-323}/P1\alpha$. **(B)** Par $P0^{212-323}/P1\beta$. **(C)** Par $P0^{212-323}/P2\alpha$. **(D)** Par $P0^{212-323}/P2\beta$. **(E)** Par $P1\alpha/P2\beta$. En cada panel se muestra el resultado de las combinaciones de proteínas de fusión del par de interacción evaluado.

2.2.2. Interacciones entre proteínas del procesamiento del ARNm

Las curvas de saturación del dador de energía para todas las combinaciones de proteínas de fusión evaluadas presentaron señal de interacción específica (Figura 14).

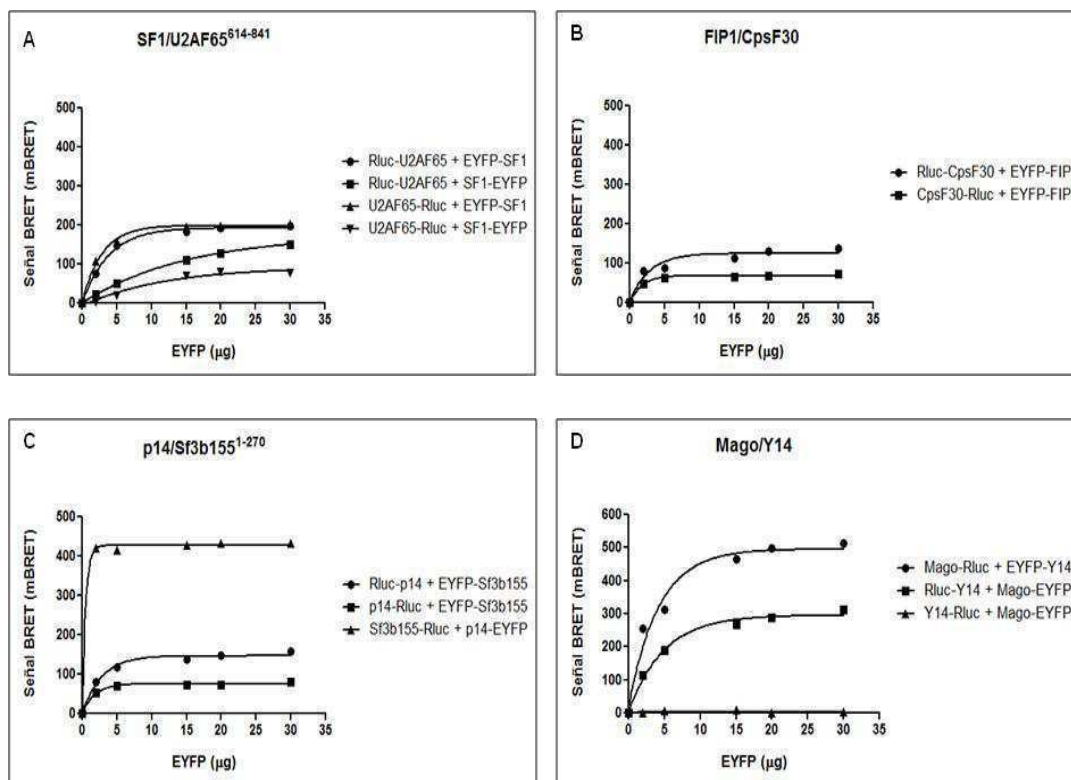


Figura 14. Curvas de saturación del dador de energía con lisados celulares para interacciones entre proteínas que participan en el procesamiento del ARNm. Se incubaron 150.000 UA de actividad luciferasa con cantidades crecientes de proteínas de un lisado que contenía al aceptor de energía (5, 15, 20 y 30 µg). La señal de fondo se determinó para 150.000 UA de actividad luciferasa, en ausencia del lisado que contenía al aceptor. Se agregó coelenterazina a 5 µM y se midió emisión a 485 y 530 nm. **(A)** Par SF1/U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹. **(B)** Par FIP1/CpsF30. **(C)** Par p14/Sf3b155¹⁻²⁷⁰. **(D)** Par Mago/Y14. En cada panel se muestra el resultado de las combinaciones de proteínas de fusión del par de interacción evaluado.

Con motivo de un cambio en el equipo de medición utilizado en los ensayos de BRET fue necesario modificar la concentración óptima del dador de energía para las curvas de saturación; en estas condiciones, se utilizó una concentración correspondiente a 15.000 UA de actividad luciferasa y se repitieron las curvas de saturación del dador de energía para los pares de interacción SF1/U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹ (combinación: U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-Rluc/EYFP-SF1); Sf3b155¹⁻²⁷⁰/p14 (combinación: Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP); y Mago/Y14 (combinación: Mago-Rluc/EYFP-Y14), los cuales presentaron señales de BRET elevadas con el equipo anterior (Figura 14 A, C y D).

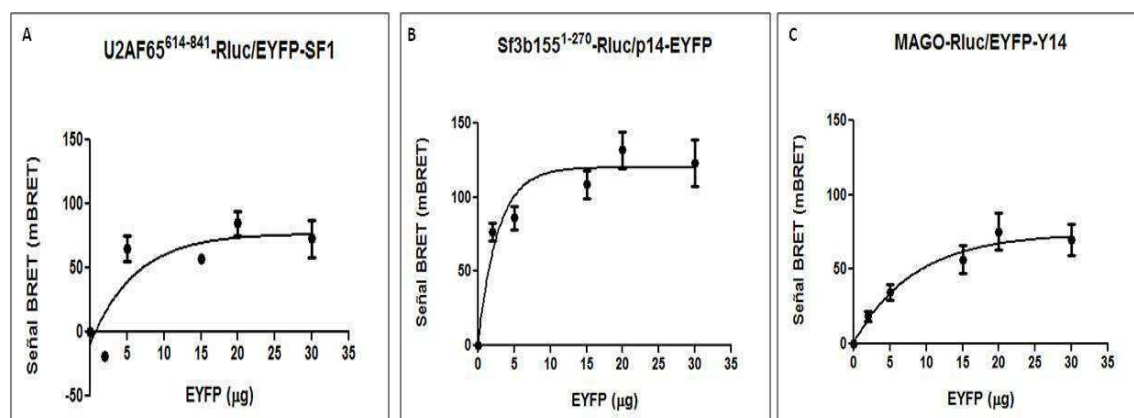


Figura 15. Curvas de saturación del dador de energía con lisados celulares para interacciones entre proteínas que intervienen en el procesamiento del ARNm. Se incubaron 15.000 UA de actividad luciferasa con cantidades crecientes de proteínas de un lisado que contenía al aceptor de energía (5, 15, 20 y 30 µg). Para determinar la señal de fondo, 15.000 UA de actividad luciferasa se incubaron en ausencia del lisado que contenía al aceptor. Se agregó coelenterazina a 5 µM y se midió emisión a 475 y 535 nm. **(A)** Par SF1/U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹, combinación: U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-Rluc/EYFP-SF1 (n=3). **(B)** Par p14/Sf3b155¹⁻²⁷⁰, combinación: Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP (n=4). **(C)** Par Mago/Y14, combinación: Mago-Rluc/EYFP-Y14 (n=4). Los resultados se expresan como el promedio ± SEM de n experimentos independientes.

Las 3 combinaciones de pares de proteínas de fusión evaluadas presentaron señal de interacción positiva para el BRET (Figura 15).

3. Búsqueda de principios activos

Para el rastreo de principios activos se utilizó como blanco la interacción p14/Sf3b155, específicamente, la combinación de proteínas de fusión: Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP, debido a que la señal de BRET fue la más elevada (Figura 15 B).

Se rastrearon extractos crudos de origen natural en busca de inhibidores de la IPP blanco. Los extractos evaluados fueron provistos por el Dr. Jorge Palermo (Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA) y como se muestra en la Tabla 3, fueron obtenidos a partir de diversas especies vegetales y una fúngica, típicas de distintas regiones del país.

Nombre científico	Nombre común	Origen	Lugar de colecta	Órganos utilizados
<i>Luehea divaricata</i>	Azota caballo, sota caballo	Vegetal	Misiones	Flores, frutos, hojas
<i>Aspidosperma australe</i>	Guatambú amarillo	Vegetal	Misiones	
<i>Aspidosperma quebracho-blanco</i>	Quebracho blanco	Vegetal	Misiones	
<i>Hyalis argentea var. latisquama</i>	Olivillo, clavelillo	Vegetal	Pcia. de Buenos Aires	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Oreja de palo colorada	Fúngico	Misiones	
<i>Bastardiopsis desinflora</i>	Loro blanco	Vegetal	Misiones	Hojas, corteza
<i>Nardophyllum bryoides</i>	-	Vegetal	Chubut	

Tabla 3. Lista de extractos utilizados en la búsqueda de inhibidores de la interacción p14/Sf3b155.

Previo al rastreo se realizaron los siguientes controles:

(1) Control positivo: por medio de un ensayo de desplazamiento se evaluó la capacidad de detectar una reducción en la señal de BRET para la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP.

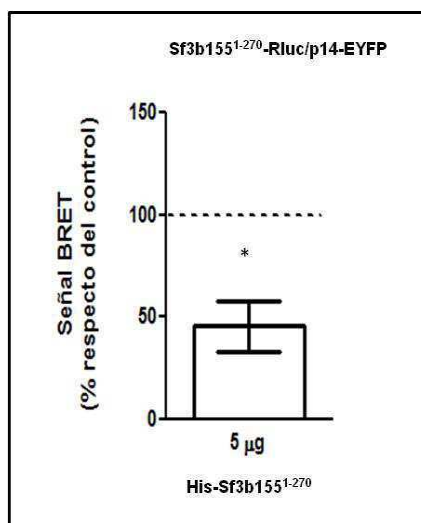


Figura 16. Ensayo de desplazamiento de la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP. Se coincubaron durante 30 min. 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 20 μg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia o ausencia de 5 μg de la proteína His-Sf3b155¹⁻²⁷⁰. Se agregó coelenterazina h 5 μM y se midió emisión a 475 y 535 nm. Los resultados se expresan como el porcentaje de la señal de BRET en presencia de His-Sf3b155¹⁻²⁷⁰, respecto de la señal en ausencia de His-Sf3b155¹⁻²⁷⁰ (control). Los datos corresponden a la media de 3

experimentos independientes \pm SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, $p < 0,05$ vs. control.

La señal de BRET para la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP se redujo significativamente en presencia de la proteína His-Sf3b155¹⁻²⁷⁰ ($p = 0,0487$); la disminución fue del 55 % respecto del control (Figura 16). Este resultado evidencia que es posible detectar por medio del ensayo de BRET una inhibición de la interacción blanco.

(2) Control de emisión del dador de energía: se evaluó la presencia en los extractos de compuestos capaces de interferir con la luminiscencia emitida por Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Para todos los extractos, la concentración inicial evaluada fue 2 μ g/ml. Se descartaron aquellos extractos que afectaron significativamente la emisión de luminiscencia, mientras que los que no la afectaron se sometieron al control siguiente.

(3) Control de emisión del aceptor de energía: se evaluó la presencia en los extractos de compuestos capaces de interferir con la fluorescencia emitida por p14-EYFP. Se descartaron aquellos extractos que afectaron significativamente la emisión de fluorescencia, mientras que los que no la afectaron se sometieron nuevamente al control de emisión del dador de energía, pero se evaluó una concentración superior (20 y 200 μ g/ml, sucesivamente).

En la Figura 17 se resume el esquema de trabajo empleado para los controles de emisión del dador y aceptor de energía.

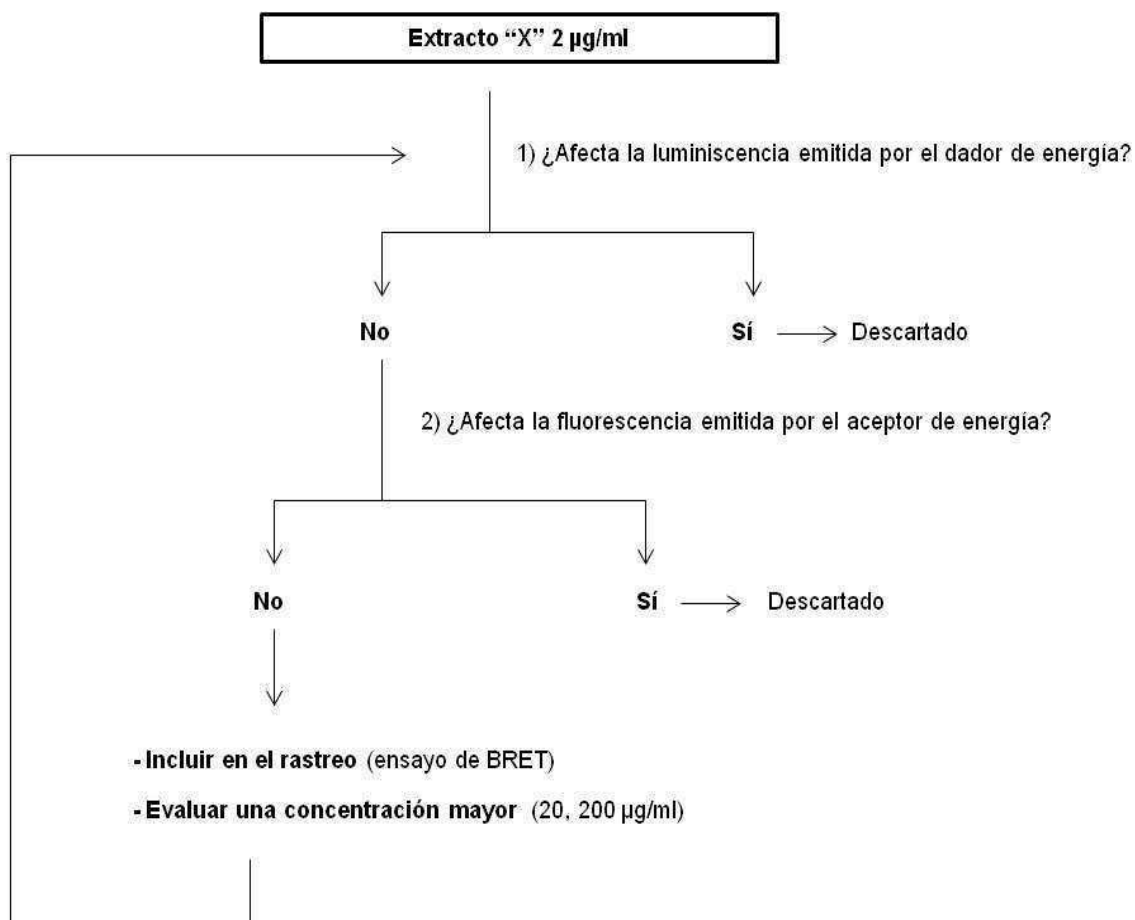


Figura 17. Esquema de trabajo empleado para los controles de emisión del dador y aceptor de energía.

Para el rastreo de inhibidores se trabajó en una condición de no saturación del dador de energía. Brevemente, se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia o ausencia del extracto a analizar. En este contexto, la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP se ubica dentro de un rango dinámico de la curva de saturación del dador de energía (ver figura 15 B) y se evita la titulación de un potencial compuesto inhibidor.

A continuación, se detalla el resultado del rastreo de inhibidores para cada extracto y sus respectivos controles de emisión del dador y aceptor de energía:

(1) Extractos de flores, frutos y hojas del árbol *Luehea divaricata*: el extracto de hojas en una concentración de 200 µg/ml provocó una disminución significativa de la luminiscencia

emitida por Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc ($p = 0,0491$). Para el resto de los tratamientos, no se observó un efecto sobre el dador de energía, ni sobre el aceptor, pero tampoco sobre la interacción blanco (Figura 18).

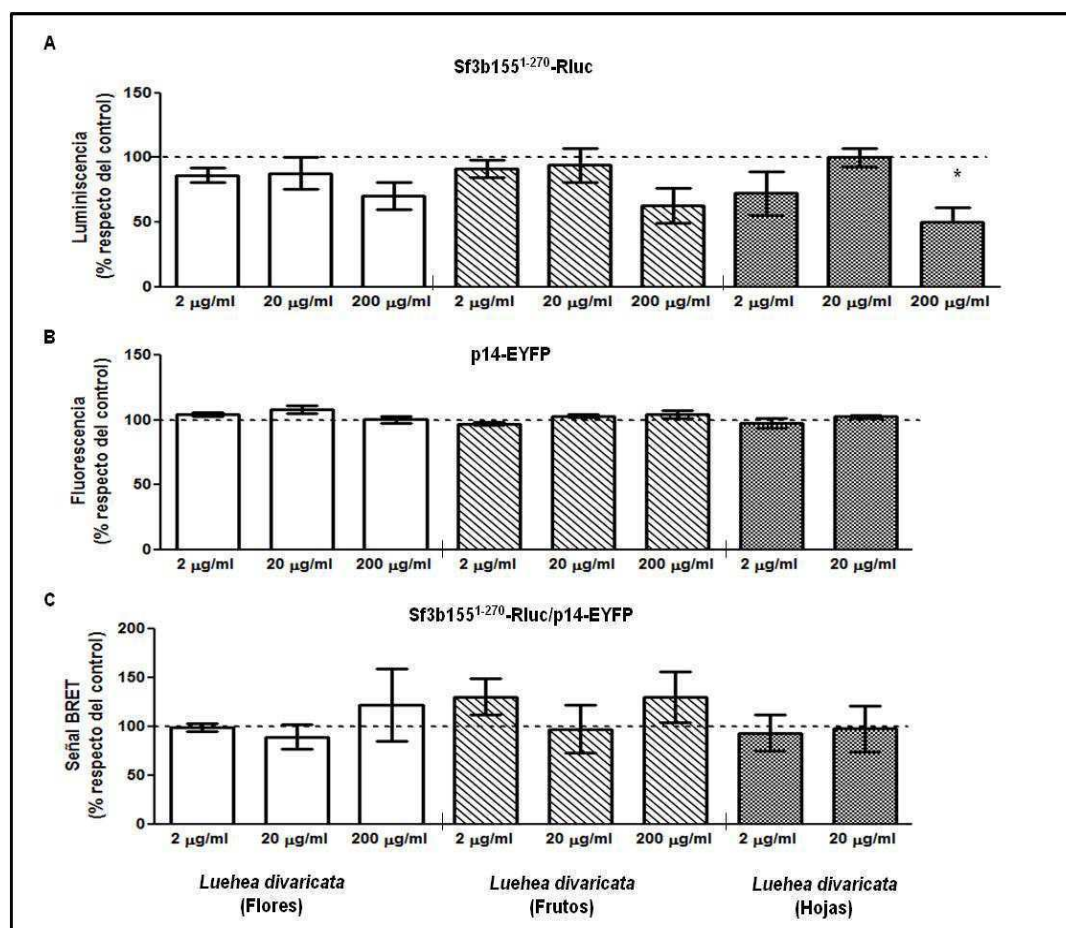


Figura 18. Extractos de flores, frutos y hojas de *Luehea divaricata*. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con los extractos (a las concentraciones indicadas) o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 nm. Flores 2, 20 y 200 µg/ml; frutos 2, 20 y 200 µg/ml y hojas 2 y 200 µg/ml (n = 3). Hojas 20 µg/ml (n = 6). **(B) Control de emisión de p14-EYFP.** Se incubaron 3 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP con los extractos (a las concentraciones indicadas) o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm. Flores 2, 20 y 200 µg/ml; frutos 2, 20 y 200 µg/ml y hojas 2 µg/ml: n = 3. Hojas 20 µg/ml: n = 6. **(C) Efecto de los extractos sobre la interacción p14/Sf3b155.** Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia de los extractos (a las concentraciones indicadas) o DMSO. Luego de 30 min., se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 y 535 nm, (n = 3). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia de los extractos, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes ± SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, $p < 0,05$ vs. control. Barras vacías: extracto de flores; barras rayadas: extracto de frutos; barras punteadas: extracto de hojas.

(2) Extracto del árbol *Aspidosperma australe*: con 2 $\mu\text{g/ml}$ no se observó un efecto sobre el dador de energía, ni sobre el aceptor, pero tampoco se observó un cambio en la señal de BRET para la interacción blanco. 20 $\mu\text{g/ml}$ del extracto provocaron una disminución significativa de la luminiscencia emitida por Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc ($p = 0,0301$) (Figura 19).

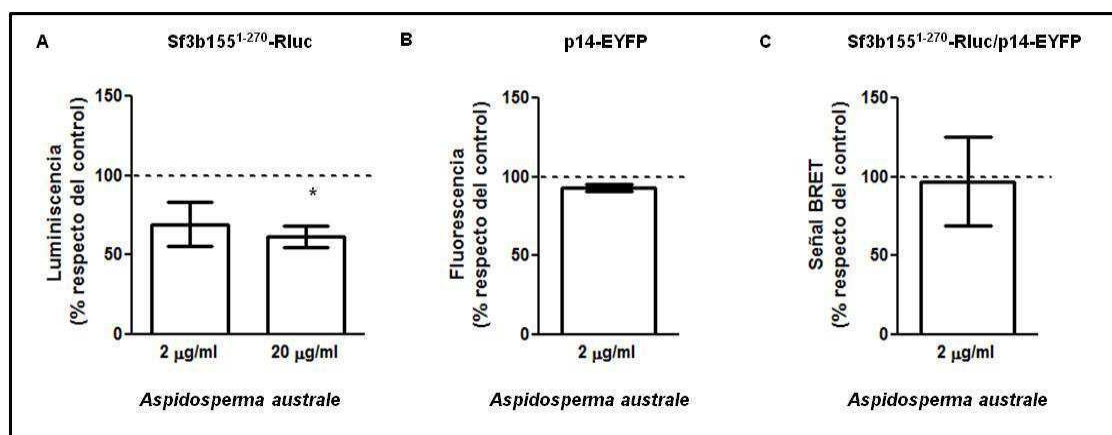


Figura 19. Extracto de *Aspidosperma australe*. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con el extracto o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 μM y se midió emisión a 475 nm, ($n = 3$). (B) Control de emisión de p14-EYFP. Se incubaron 3 μg de un lisado que contenía a p14-EYFP con el extracto o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm, ($n = 3$). (C) Efecto sobre la interacción p14/Sf3b155. Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 μg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 μM y se midió emisión a 475 y 535 nm, ($n = 4$). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes \pm SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, $p < 0,05$ vs. control.

(3) Extracto del árbol *Aspidosperma quebracho-blanco*: en este caso se evaluó únicamente una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. No se observó un efecto sobre el dador, ni el aceptor de energía, pero tampoco se logró inhibir la interacción blanco (Figura 20).

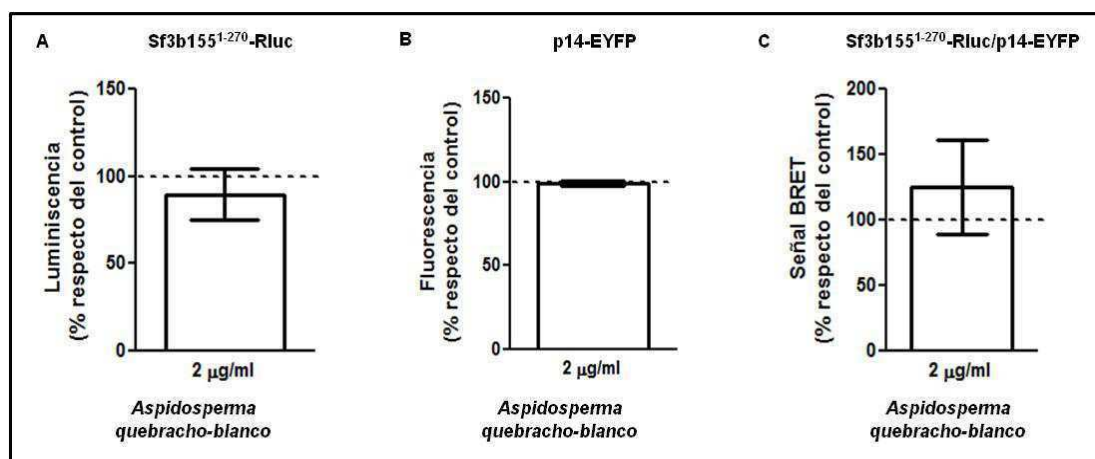


Figura 20. Extracto de *Aspidosperma quebracho-blanco*. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con el extracto o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 nm, (n = 3). (B) Control de emisión de p14-EYFP. Se incubaron 3 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP con el extracto o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm, (n = 3). (C) Efecto sobre la interacción p14/Sf3b155. Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 y 535 nm, (n = 4). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes ± SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra.

(4 y 5) Extracto de la hierba *Hyalis argentea var. latisquama* y extracto del hongo *Pycnoporus sanguineus*: en ambos casos, 2 µg/ml no afectaron al dador, ni al aceptor de energía, pero tampoco la señal de la interacción blanco. Asimismo, 20 µg/ml de los extractos provocaron una disminución significativa de la luminiscencia emitida por Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc ($p = 0,0497$ y $p = 0,0476$, respectivamente) (Figuras 21 y 22).

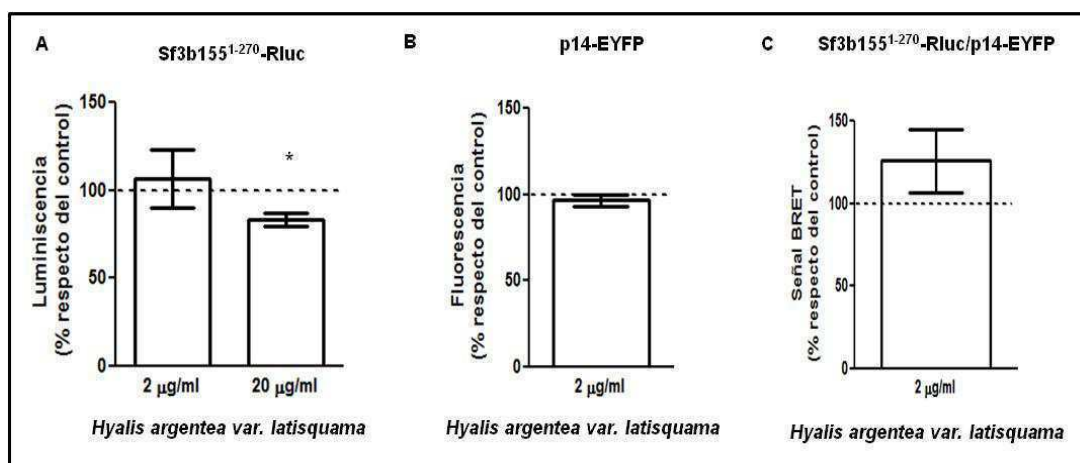


Figura 21. Extracto de *Hyalis argentea* var. *latisquama*. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con el extracto o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 nm, (n=3). (B) Control de emisión de p14-EYFP. Se incubaron 3 μ g de un lisado que contenía a p14-EYFP con el extracto o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm, (n=3). (C) Efecto sobre la interacción p14/Sf3b155. Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 μ g del lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 y 535 nm, (n=4). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes \pm SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, $p < 0,05$ vs. control.

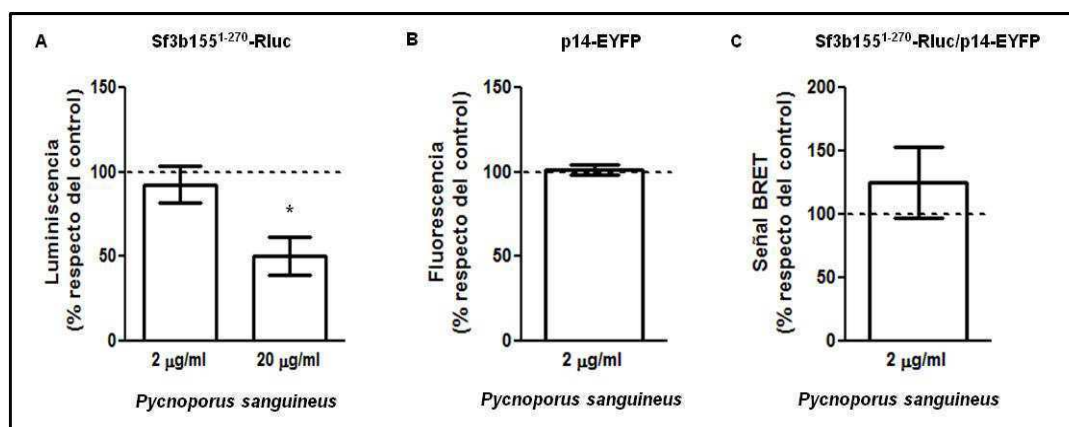


Figura 22. Extracto de *Pycnoporus sanguineus*. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con el extracto o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 nm, (n=3). (B) Control de emisión de p14-EYFP. Se incubaron 3 μ g de un lisado que contenía a p14-EYFP con el extracto o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm, (n=3). (C) Efecto sobre la interacción p14/Sf3b155. Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 μ g de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 y 535 nm, (n=4). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes \pm SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, $p < 0,05$ vs. control.

(6) Extractos de hojas y corteza del árbol *Bastardiopsis desinflora*: la fracción de las hojas, en una concentración de 2 μ g/ml, no afectó al dador, ni al aceptor de energía, pero tampoco la interacción blanco; 20 μ g/ml modificaron significativamente la fluorescencia emitida por p14-EYFP ($p = 0,0186$). Con 2 μ g/ml del extracto de la corteza se observó una disminución significativa de la luminiscencia emitida por Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc ($p = 0,0112$), (Figura 23).

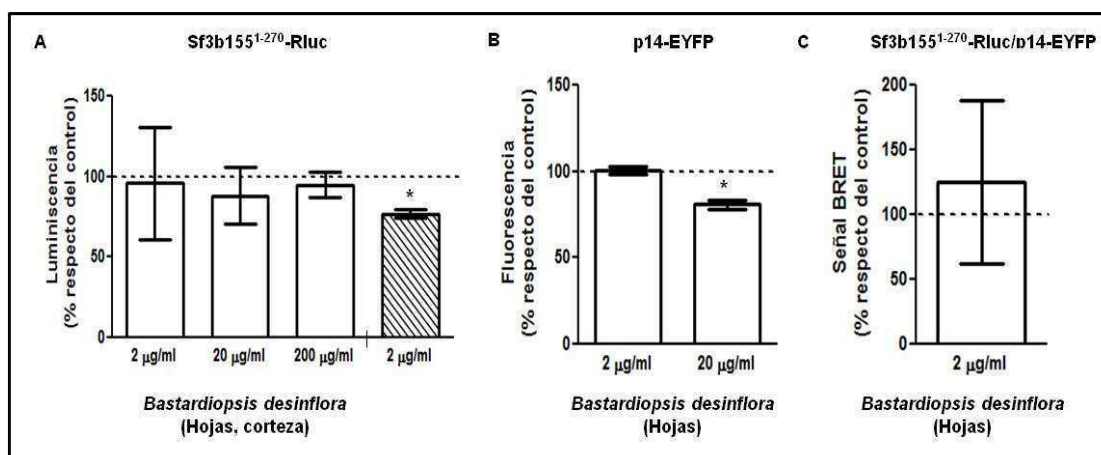


Figura 23. Extractos de hojas y corteza de *Bastardiopsis desinflora*. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con los extractos o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 nm. Hojas 2, 20 µg/ml; corteza 2 µg/ml (n = 3). Hojas 200 µg/ml (n = 5). (B) Control de emisión de p14-EYFP. Se incubaron 3 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP con el extracto o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm, (n = 3). (C) Efecto sobre la interacción p14/Sf3b155. Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 y 535 nm, (n = 4). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes ± SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, p < 0,05 vs. control. Barras vacías: extracto de hojas; barras rayadas: extracto de corteza.

(7) Extracto de *Nardophyllum bryoides*: con 2 y 20 µg/ml no hubo un efecto sobre el dador, ni el aceptor de energía, pero tampoco sobre la señal de la interacción blanco. El extracto modificó significativamente la emisión de luminiscencia de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc cuando se utilizó una concentración de 200 µg/ml (p = 0,0231) (Figura 24).

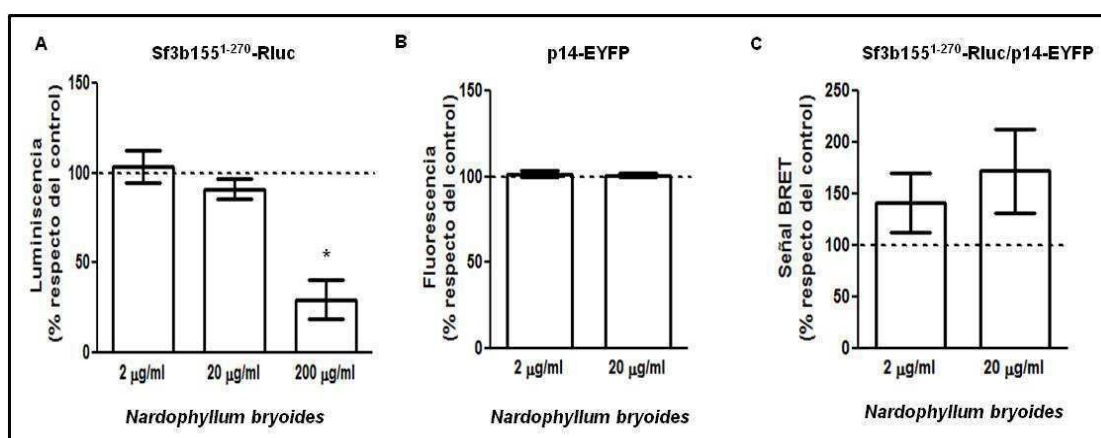


Figura 24. Extracto de *Nardophyllum bryoides*. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con el extracto o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 nm. 2 y 200 μ g/ml (n=3); 20 μ g/ml (n=6). **(B) Control de emisión de p14-EYFP.** Se incubaron 3 μ g de un lisado que contenía a p14-EYFP con el extracto o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm. 2 μ g/ml (n=3); 20 μ g/ml (n=6). **(C) Efecto sobre la interacción p14/Sf3b155.** Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 3 μ g de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 y 535 nm, (n=4). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes \pm SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, p < 0,05 vs. control.

Los extractos evaluados nos fueron capaces de inhibir la interacción entre las proteínas p14 y Sf3b155. No obstante, se observó que algunos presentaron una tendencia a aumentar la señal de BRET de la interacción blanco. Tal fue el caso del extracto de frutos de *Luehea divaricata* 2 μ g/ml (Figura 18 C), del extracto de *Hyalis argentea var. latisquama* 2 μ g/ml (Figura 21 C) y del extracto de *Nardophyllum bryoides* 2 y 20 μ g/ml (Figura 24 C).

Esta propiedad resulta interesante, ya que podría derivar en efectos biológicos mediados por la modulación de la interacción por parte del extracto, por ejemplo, a través de un aumento en la afinidad entre las proteínas interactuantes. Para profundizar sobre esta propiedad se evaluó el efecto de los extractos sobre la interacción blanco mediante ensayos de BRET en una condición de saturación del dador de energía, asumiendo que la presencia del extracto desplazaría el equilibrio de la reacción hacia la formación de complejos Sf3b155-p14 y que debido a que en el rango dinámico de la curva de saturación del dador de energía no todas las molécula del dador y aceptor interactúan (Figura 8 A), una condición de saturación del dador de energía resultaría más apropiada para detectar dicho efecto.

Para el ensayo, se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 20 μ g de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia o ausencia del extracto a evaluar. En estas condiciones la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP se ubica dentro del rango de saturación del dador de energía (ver figura 15 B).

El extracto de frutos de *Luehea divaricata* y el de *Hyalis argentea var. latisquama* no tuvieron un efecto significativo sobre la interacción blanco (Figura 25 A y B, respectivamente). Sin embargo, 20 μ g/ml del extracto de *Nardophyllum bryoides*, provocaron un incremento en la señal de BRET, de aproximadamente 40 %, que resultó estadísticamente significativo (p = 0,0011) (Figura 25 C).

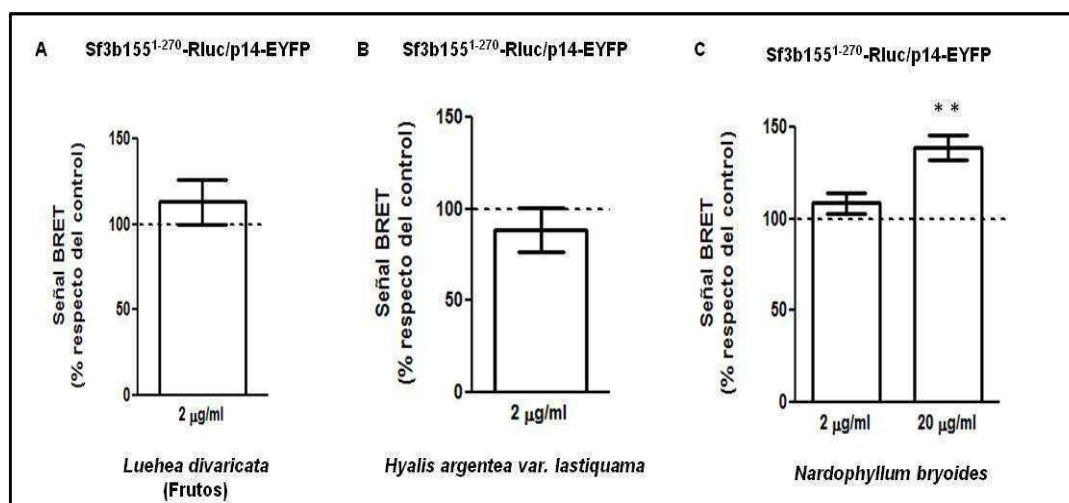


Figura 25. Efecto de distintos extractos sobre la interacción p14/Sf3b155. Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 20 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia de distintos extractos o DMSO. Se agregó coelenterazina a 5 µM y se midió emisión a 475 y 535 nm. **(A)** Extracto de frutos de *Luehea divaricata* 2 µg/ml (n = 3). **(B)** Extracto de *Hyalis argentea* var. *lastiquama* 2 µg/ml (n = 3). **(C)** Extracto de *Nardophyllum bryoides* 2 µg/ml (n = 4) y 20 µg/ml (n = 7). Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal de BRET obtenida en presencia de los extractos, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de n experimentos independientes ± SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. **, p < 0,01 vs. control.

Nuestra hipótesis de trabajo original se basó en la búsqueda de extractos capaces de inhibir interacciones esenciales entre proteínas de *T. cruzi*, como potencial fuente de compuestos antiparasitarios. Teniendo en cuenta que uno de los factores importantes para mantener la homeostasis de un organismo involucra la regulación temporal de sus interacciones, consideramos que una modulación positiva de la interacción p14/Sf3b155 también podría derivar en propiedades antiparasitarias. A fin de verificar esta nueva hipótesis, se amplió el estudio del efecto del extracto de *Nardophyllum bryoides*.

4. Estudios complementarios del extracto de *Nardophyllum bryoides*

4.1. Efecto del extracto sobre la interacción U2AF65/SF1

Con el objeto de determinar si el efecto del extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre el par Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP es ejercido a nivel de la interacción entre las proteínas Sf3b155¹⁻²⁷⁰ y p14, o bien, a nivel de la interfase que se genera entre Rluc y EYFP cuando las proteínas de fusión interactúan, se evaluó por medio de un ensayo de BRET el efecto del extracto sobre una segunda interacción, U2AF65/SF1; específicamente, se utilizó la

combinación de proteínas de fusión, U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-Rluc/EYFP-SF1. El ensayo se realizó en una condición de saturación del dador de energía y se utilizó la concentración del extracto con la que se observó el efecto sobre la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP, o sea, 20 µg/ml.

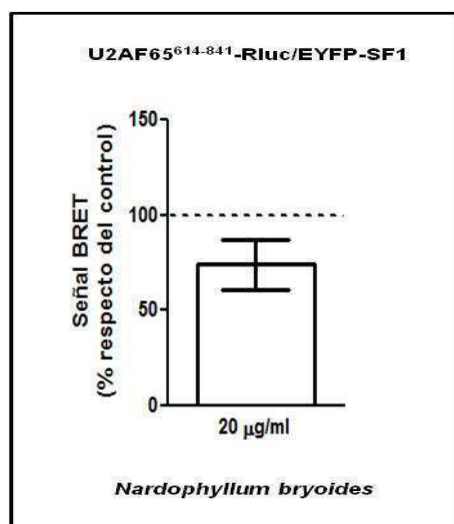


Figura 26. Efecto del extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre la interacción U2AF65/SF1. Se coincubaron 15.000 UA de U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-Rluc con 20 µg de un lisado que contenía a EYFP-SF1, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 y 535 nm. El resultado se expresa como el porcentaje de la señal de BRET obtenida en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de 3 experimentos independientes ± SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra.

El extracto de *Nardophyllum bryoides* no aumentó la señal de BRET de la interacción U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-Rluc/EYFP-SF1 (Figura 26) y, por lo tanto, no estaría facilitando la transferencia de energía a nivel de la interfase entre Rluc y EYFP. Este resultado refuerza la hipótesis de que el extracto actuaría específicamente a nivel de la interacción p14/Sf3b155.

4.2. Efecto de una fracción rica en ácido secochiliolídico sobre la interacción Sf3b155/p14

Con el fin de obtener información acerca de la naturaleza química del compuesto modulador, se evaluó, por medio de un ensayo de BRET, el efecto de una fracción del extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP; específicamente, se analizó una fracción rica en ácido secochiliolídico, provista por el Dr.

Jorge Palermo. Para la obtención de esta fracción, el extracto fue sometido a una extracción ácido-base y la fracción ácida se permeó a través de una cromatografía de exclusión con gel dextrano de enlaces cruzados (Sephadex LH-20) y se reunieron las fracciones que contenían al ácido secochiliolídico. El ensayo de BRET se realizó en condiciones de saturación del dador de energía, luego de realizar los controles de emisión del dador y aceptor de energía.

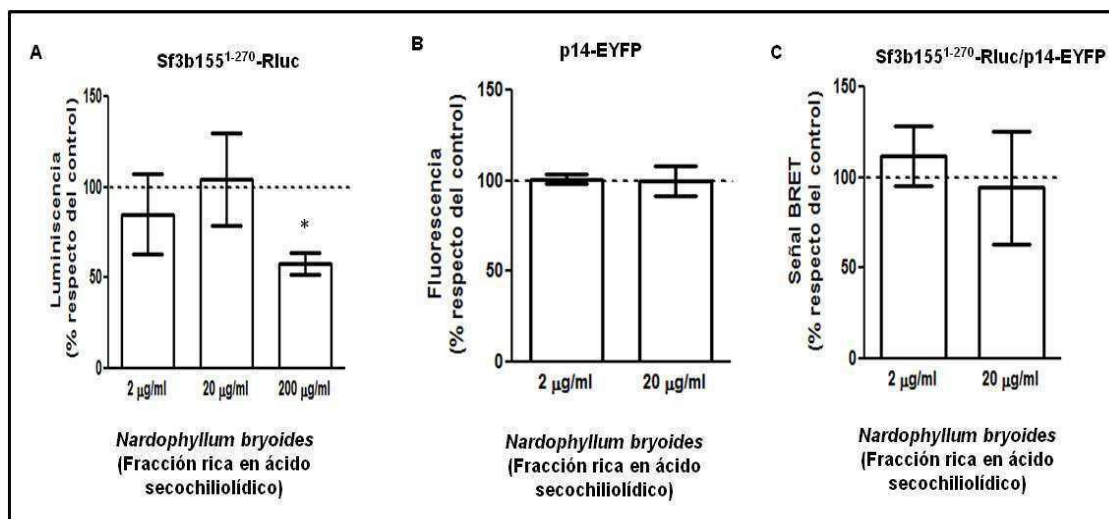


Figura 27. Fracción del extracto de *Nardophyllum bryoides* rica en ácido secochiliolídico. (A) Control de emisión de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc. Se incubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con el extracto o con DMSO (control). Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 nm. **(B) Control de emisión de p14-EYFP.** Se incubaron 20 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP con el extracto o con DMSO. Se excitó a 485 nm y se midió emisión a 535 nm. **(C) Efecto sobre la interacción p14/Sf3b155.** Se coincubaron 15.000 UA de Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc con 20 µg de un lisado que contenía a p14-EYFP, en presencia del extracto o DMSO. Se agregó coelenterazina h 5 µM y se midió emisión a 475 y 535 nm. Para todos los casos, los resultados se expresan como el porcentaje de la señal en presencia del extracto, respecto de la señal del control. Los datos corresponden a la media de 3 experimentos independientes ± SEM y fueron analizados mediante una prueba t de Student para una muestra. *, p < 0,05 vs. control.

La fracción rica en ácido secochiliolídico afectó significativamente la luminiscencia emitida por Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc, con una concentración de 200 µg/ml (p = 0,018). Para el resto de los tratamientos, no se observó un efecto significativo sobre el dador de energía, ni sobre el aceptor, pero tampoco sobre la interacción blanco (Figura 27).

4.3. Propiedades antiparasitarias del extracto de *Nardophyllum bryoides*

Para evaluar si el extracto de *Nardophyllum bryoides* posee propiedades antiparasitarias se estudió su efecto sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y. Para ello,

cultivos de parásitos fueron incubados en presencia de distintas concentraciones del extracto y se monitoreó su proliferación cada 24 horas durante 3 días.

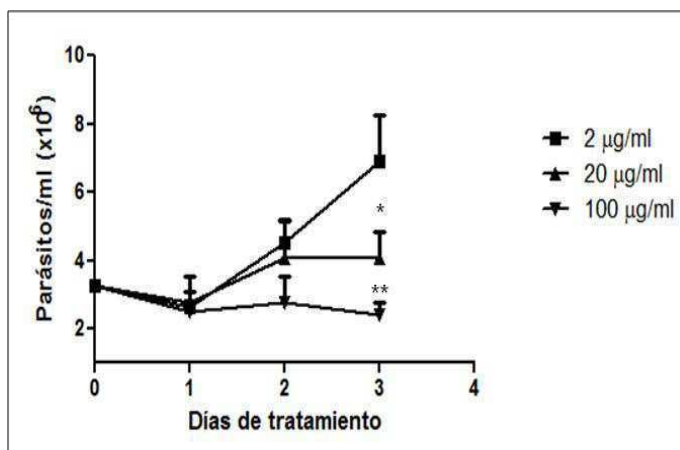


Figura 28. Efecto de un extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. Cultivos de $3,3 \times 10^6$ parásitos/ml fueron incubados durante 3 días con el extracto a las concentraciones indicadas y se monitoreó su crecimiento cada 24 horas por conteo en cámara de Neubauer. Los resultados se expresan como el promedio + SEM de 3 experimentos independientes y fueron analizados mediante una prueba de Anova de una vía, seguida por un *test* de Tukey de comparaciones múltiples. **, $p < 0,01$ vs. 2 µg/ml; *, $p < 0,05$ vs. 2 µg/ml.

Para las 3 concentraciones evaluadas (2, 20 y 100 µg/ml) el extracto de *Nardophyllum bryoides* detuvo la proliferación de epimastigotes durante las primeras 24 horas de tratamiento. A pesar de que a las 48 horas los parásitos tratados con 2 y 20 µg/ml lograron restaurar su proliferación, luego de 72 horas, el número de parásitos para el tratamiento con 20 µg/ml permaneció constante y resultó significativamente menor a los tratados con 2 µg/ml ($p < 0,05$). Los epimastigotes tratados con 100 µg/ml no lograron recuperar su crecimiento, observándose una actividad antiparasitaria significativa a partir de las 72 horas con respecto al tratamiento con 2 µg/ml ($p < 0,01$; Figura 28).

4.4. Citotoxicidad del extracto de *Nardophyllum bryoides*

Debido a que el rastreo de principios activos posee en última instancia fines terapéuticos, se evaluó la citotoxicidad del extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre células humanas. Para ello, células HEK 293T fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes del extracto y luego de 24 horas se realizó un ensayo de viabilidad celular por tinción con

crystal violeta. La concentración inhibitoria media (IC_{50}) del extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre células HEK 293T fue 54,14 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 29).

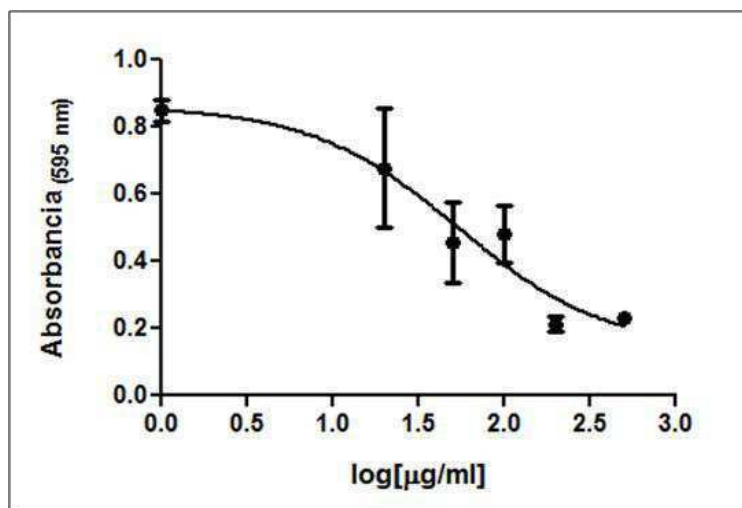


Figura 29. Citotoxicidad de un extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre células humanas. Se incubaron 15.000 células HEK 293T con concentraciones crecientes del extracto (0, 20, 50, 100, 200 y 500 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas. Las células se tiñeron con el colorante cristal violeta 0,5% y se midió absorbancia a 595 nm. La curva corresponde a los valores de absorbancia en función del logaritmo de la concentración del extracto. El resultado se expresa como el promedio \pm DE de 4 experimentos independientes.

Discusión

Con el objeto de realizar una búsqueda de extractos naturales con propiedades antiparasitarias se consideraron como potenciales blancos moleculares una serie de interacciones proteína-proteína de *T. cruzi*, teniendo en cuenta que compuestos con capacidad de inhibir interacciones esenciales del parásito podrían ser utilizados como base para el desarrollo de nuevos fármacos contra la Enfermedad de Chagas. En este contexto, se seleccionaron interacciones entre proteínas que intervienen en procesos metabólicos esenciales de *T. cruzi*, como el procesamiento del ARNm o que forman parte de estructuras esenciales, como la protuberancia de la subunidad mayor del ribosoma; además, estas interacciones presentan características exclusivas respecto de sus ortólogos en humanos, razones por las cuales constituyen blancos interesantes para el desarrollo de una potencial terapia antiparasitaria.

En trabajos previos se demostró con éxito que la interrupción de una interfase de interacción entre proteínas, por moléculas pequeñas, tiene consecuencias directas sobre la viabilidad de *T. cruzi*. La triosafosfato isomerasa, enzima que funciona en forma de dímero, posee diferencias en la interfase de dimerización respecto de su contraparte humana y fue propuesta como blanco de drogas (Maldonado, Soriano-García y col. 1998); se demostró que la molécula pequeña, ácido 3-(2-benzotiazolyltio)-1-propanesulfónico, se une a la interfase de interacción del dímero y anula la función enzimática con alta selectividad, ya que no afecta el dímero humano (Tellez-Valencia, Olivares-Illana y col. 2004). Asimismo, otra molécula pequeña, ditiodianilina, también interrumpe selectivamente la función enzimática y mata al parásito en cultivo (Olivares-Illana, Rodríguez-Romero y col. 2007). Estos antecedentes resaltan el potencial de las IPPs como blancos de terapias antiparasitarias.

La búsqueda de compuestos antiparasitarios se realizó por medio de ensayos de BRET, técnica utilizada anteriormente con resultados satisfactorios en rastreos de inhibidores de IPPs (Corbel, Wang y col. 2011, Cochran, Diggs y col. 2014). Esta metodología permite evaluar interacciones proteicas a través de la transferencia de energía por resonancia entre un dador (Rluc) y un aceptor (EYFP) de energía, fusionados a las proteínas de interés (Bacart, Corbel y col. 2008). Considerando que la señal de BRET depende, entre otros factores, de la orientación relativa de los pares de proteínas de fusión (Bacart, Corbel y col. 2008) y ante la imposibilidad de predecir la combinación de proteínas de fusión con la señal de BRET más elevada, cada proteína de interés fue subclonada en los 4 plásmidos destino para el BRET, generando la fusión a Rluc y a EYFP, tanto en orientación N-, como C-

terminal. De esta manera, para cada par de interacción se analizaron hasta 8 combinaciones diferentes de pares de proteínas de fusión, lo cual permitió determinar la combinación con la señal de BRET más elevada. Asimismo, este enfoque permitió descartar aquellas fusiones que generaron impedimentos estéricos y por lo tanto, obstaculizaron la transferencia de energía, derivando en una baja señal de interacción.

Para el análisis de las IPPs se realizaron curvas de saturación del dador de energía a través de la coincubación de una cantidad constante del dador con cantidades crecientes del aceptor. Para estas curvas, se estandarizó la concentración del dador de energía debido a que un exceso de moléculas de Rluc derivaría en la saturación del dador con altas concentraciones de EYFP; mientras que la cantidad de Rluc por defecto, provocaría la saturación con bajas concentraciones del aceptor; siendo ambos casos, poco favorables para la obtención de una curva de saturación del dador de energía típica de una interacción específica.

En primera instancia, el análisis se realizó en células vivas y se evaluaron las 8 combinaciones de proteínas de fusión posibles para cada par de interacción considerado como blanco para el rastreo (Figuras 10 y 11). En estos ensayos, la cantidad óptima del dador de energía fue establecida en 0,4 µg del plásmido que contenía al dador de energía. Se descartaron las combinaciones que presentaron una señal de BRET negativa y aquellas cuya señal aumentó linealmente en función del aceptor, casos típicos de interacciones inespecíficas, en las que las proteínas interactúan entre sí de manera estocástica (Bacart, Corbel y col. 2008). Además, debido a que en un rastreo de inhibidores es indispensable que la señal de interacción sea elevada, de manera de poder detectar su disminución, también se descartaron las combinaciones cuya señal máxima resultó inferior a 50 mBRET. Considerando que en trabajos previos se demostró la existencia de interacción para todos los pares de proteínas analizados (Juri Ayub, Smulski y col. 2005, Avila, Bercovich y col. 2007, Bercovich, Levin y col. 2009, Bercovich, Levin y col. 2009, Vazquez, Mualem y col. 2009), es posible suponer que las combinaciones descartadas constituyan resultados falsos negativos, obtenidos como consecuencia de la conformación espacial adoptada por las proteínas de fusión. No obstante, todos los pares de proteínas presentaron señal de interacción específica en alguna de las combinaciones. En base a esta observación podemos concluir que la metodología elegida para realizar el rastreo de inhibidores es efectiva en la detección de las interacciones seleccionadas. Asimismo, en concordancia con lo reportado por Juri Ayub, M. y col. (2005) mediante un ensayo cuantitativo de doble híbrido en levaduras (Juri Ayub, Smulski y col. 2005), el par P0²¹²⁻³²³/P1β representó la interacción

más fuerte entre las proteínas P ribosomales debido a que la combinación RLuc-PO²¹²⁻³²³/EYFP-P1β alcanzó la señal de BRET más elevada (aproximadamente, 250 mBRET; Figura 10 B).

El siguiente paso consistió en evaluar las interacciones utilizando lisados celulares que contenían al dador y al aceptor de energía. Para estos casos, se estableció que la concentración óptima del dador de energía correspondía a 150.000 UA de actividad luciferasa. El criterio inicial para la selección de las combinaciones de proteínas de fusión que se evaluaron se basó en utilizar aquellas cuya señal de BRET había resultado positiva en los ensayos en células vivas; sin embargo, en casos tales como RLuc-P2β/PO²¹²⁻³²³-EYFP, P2β-RLuc/EYFP-P1α y P2β-RLuc/P1α-EYFP, la señal resultó negativa al medir la transferencia de energía en lisados celulares (Figura 13 D y E, respectivamente, vs. Figura 10 D y E, respectivamente). Por lo tanto, frente a estas observaciones, la selección de las combinaciones se realizó sin considerar los resultados obtenidos en células vivas. Interesantemente, de esta manera se detectaron dos combinaciones con señal de interacción específica en lisados celulares (RLuc-PO²¹²⁻³²³/P1α-EYFP y RLuc-P1α/PO²¹²⁻³²³-EYFP) y que previamente habían resultado negativas (Figura 13 A, vs. Figura 10 A). En conjunto, estas observaciones indican que no es posible establecer una correlación entre los resultados del ensayo de BRET en células vivas y lisados celulares, y resaltan la importancia de analizar la mayor cantidad de combinaciones de proteínas de fusión para cada par de interacción.

Teniendo en cuenta que para la búsqueda de principios activos se rastrearon extractos crudos de origen natural (Tabla 3), los cuales presentan una gran complejidad ya que están conformados por una mezcla altamente heterogénea de compuestos, consideramos que el rastreo en lisados celulares es más adecuado que en células vivas; para un rastreo en células vivas los compuestos deberían ser permeables a la membrana plasmática, resistentes a la degradación celular y no tóxicos, condiciones que no se pueden determinar *a priori* en extractos crudos. En este punto, cabe destacar que como parte de una colaboración internacional, el análisis de las IPPs se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Dusetti, mientras que el rastreo de inhibidores se realizó en nuestro laboratorio. En este sentido y, a raíz del cambio en el equipo de medición, se buscaron nuevamente las condiciones óptimas para el ensayo de BRET en lisados celulares y se estableció que la concentración de moléculas del dador de energía apropiada era la equivalente a 15.000 UA de actividad luciferasa.

Para evaluar las nuevas condiciones de trabajo se repitieron las curvas de saturación del dador de energía para los pares de proteínas, U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-RLuc/EYFP-SF1, Sf3b155¹⁻²⁷⁰-

Rluc/p14-EYFP y Mago-Rluc/EYFP-Y14, los cuales habían alcanzado una señal de interacción elevada al realizar el ensayo en el laboratorio del Dr. Duseti (Figura 14 A, C y D, respectivamente). En los tres casos, el valor máximo de la señal de BRET resultó inferior a la obtenida con las condiciones anteriores, pero las curvas de saturación mantuvieron una forma hiperbólica (Figura 15 A, B y C, respectivamente); concluimos, por lo tanto, que las condiciones establecidas resultaron satisfactorias para detectar la presencia de interacciones específicas.

Como blanco molecular para el rastreo de inhibidores se seleccionó la interacción p14/Sf3b155¹⁻²⁷⁰ debido a que la señal de BRET resultó ser la más elevada (Figura 15 B). Interesantemente, trabajos recientes postularon que la presencia de mutaciones “*hotspot*” en la proteína Sf3b humana podría ser utilizada como blanco de intervención quimioterapéutica en cáncer debido a la asociación entre estas mutaciones y varios tipos de tumores (Webb, Joyner y col. 2013, Maguire, Leonidou y col. 2015). En relación con esto, autores independientes aislaron productos naturales de bacterias que poseen como blanco de acción al complejo Sf3b, e incluso, se diseñaron derivados semisintéticos de algunos de estos compuestos (Webb, Joyner y col. 2013). En uno de estos trabajos, se sugirió la posibilidad de aprovechar diferencias especie-específicas en Sf3b de modo de adaptar estos compuestos para el tratamiento de infecciones parasitarias o fúngicas (Rymond 2007). Si bien en el rastreo de inhibidores no se analizaron estos compuestos, consideramos que la sugerencia de los autores apoya la utilización de la interacción Sf3b155/p14 como potencial blanco molecular para una terapia antiparasitaria, especialmente teniendo en cuenta las diferencias reportadas para estas proteínas entre *T. cruzi* y humanos (Avila, Bercovich y col. 2007).

Como se mencionó previamente, para la búsqueda de inhibidores se rastrearon extractos crudos de distintas fuentes naturales. La utilización de productos naturales se encuentra estrechamente vinculada a la medicina tradicional desde hace miles de años, hallándose registros que datan desde la Edad Antigua. Si bien en los últimos años la industria farmacéutica cambió sus estrategias de descubrimiento de fármacos para incluir bibliotecas de compuestos provenientes de la química combinatoria, los resultados no fueron prometedores (Myers 1997) y los informes de nuevas entidades químicas bioactivas demuestran que los productos naturales continúan siendo una fuente significativa de nuevas drogas terapéuticas, además de que constituyen más del 50 % de la base de las drogas de uso comercial (Newman and Cragg 2012). Una característica fundamental de los productos de origen natural radica en su enorme diversidad estructural y química, en comparación con

las bibliotecas de compuestos sintéticos (Lee and Schneider 2001); es por ello, que estos compuestos ocupan un espacio químico diferente al de los compuestos sintéticos, posicionándolos como una alternativa atractiva para el descubrimiento de fármacos, especialmente en áreas terapéuticas con escasez de compuestos líderes (Feher and Schmidt 2003). En particular, los productos naturales constituyen una fuente importante de agentes quimioterapéuticos para enfermedades infecciosas y muchos de estos compuestos exhiben una alta actividad tripanocida (Salem and Werbovetz 2006). En este sentido, es interesante resaltar que parte de los extractos ensayados sobre la interacción p14/Sf3b155 presentaron previamente actividad antiparasitaria: el ácido secochiliolídico, uno de los compuestos mayoritarios del extracto de *Nardophyllum bryoides*, y ciertos derivados semisintéticos del mismo, poseen actividad tripanocida sobre epimastigotes de *T. cruzi*, siendo capaces de inhibir la proliferación de los parásitos con concentraciones inhibitorias medias comparables a la de la droga comercial, Beznidazol (Siless, Lozano y col. 2013); asimismo, se reportó actividad antimalárica para un extracto de *Aspidosperma quebracho-blanco* (Bourdy, Oporto y col. 2004) y el aislamiento de un compuesto activo contra amastigotes de *Leishmania (viannia)* a partir de un extracto de *Pycnopus sanguineus* (Correa, Cardona y col. 2006). Teniendo en cuenta lo mencionado, consideramos que el rastreo de extractos crudos de origen natural, en busca de compuestos con propiedades antiparasitarias, resulta promisorio para el hallazgo de nuevas drogas terapéuticas. Más aún, la utilización de estos extractos permite aumentar la robustez del rastreo y consecuentemente, la posibilidad de encontrar principios activos, ya que la misma es directamente proporcional a la biodiversidad analizada.

Por medio de un ensayo de desplazamiento de la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP, utilizando a la proteína His-Sf3b155¹⁻²⁷⁰ como competidor, se verificó que es posible detectar una disminución en la señal de BRET para la interacción blanco (Figura 16). Este resultado indica que el sistema puede ser “apagado”, incluso cuando la proteína dadora Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc se encuentra en una condición de saturación.

Por otra parte, por medio de los controles de emisión del dador y aceptor de energía se descartaron potenciales resultados falsos positivos o falsos negativos, generados como consecuencia de la presencia en los extractos de moléculas coloreadas o fluorescentes así como también, de moléculas capaces de unirse a Rluc, EYFP o a la región *linker* de la proteínas de fusión (Bacart, Corbel y col. 2008). Estas moléculas podrían interferir con las propiedades de absorción del ensayo, ejerciendo un efecto específico sobre Rluc o EYFP y no sobre la interacción blanco. En este contexto, la utilización de extractos crudos presenta

una desventaja respecto de las bibliotecas de compuestos puros, dado que las mezclas complejas contienen compuestos que en su mayoría no se encuentran caracterizados y que pueden presentar propiedades no deseadas.

A fin de evitar una titulación de un potencial compuesto inhibidor, el rastreo se realizó en una condición de no saturación del dador de energía; no obstante, ninguno de los extractos evaluados fue capaz de disminuir la señal de BRET de la interacción p14/Sf3b155. Si bien este resultado se puede atribuir a una ausencia de moléculas capaces de inhibir de manera específica la interacción blanco, no se descarta la presencia de inhibidores cuya actividad fue enmascarada por otras moléculas que conforman los extractos, y/o que se encontraban en baja proporción, y por lo tanto, no haya sido posible detectarlos. A pesar de que las dos últimas alternativas constituyen desventajas propias del empleo de extractos crudos, es posible plantear que las condiciones del ensayo de BRET no fueron óptimas para evitar la titulación de un potencial inhibidor poco representado en un extracto. Teniendo en cuenta que la ventana ideal para realizar un rastreo de inhibidores se encuentra dentro de un rango de concentraciones de moléculas de aceptor (Couturier and Deprez 2012), una posibilidad para evidenciar el efecto hubiera consistido en utilizar una menor cantidad de moléculas de p14-EYFP; sin embargo, en base a nuestro sistema de trabajo, esta alternativa hubiera implicado partir de una señal de interacción baja, lo cual dificultaría su detección por parte del equipo de medición.

Si bien el resultado del rastreo no cumplió el objetivo de hallar extractos con capacidad de inhibir la interacción blanco, el hecho de que ciertos extractos mostraran una tendencia a aumentar la señal de la interacción p14/Sf3b155 nos llevó a suponer la presencia de moléculas capaces de modular positivamente la interacción y desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación del par interactuante. Reforzando esta idea, el extracto de *Nardophyllum bryoides* (en una concentración de 20 µg/ml), provocó un aumento estadísticamente significativo de la señal cuando se realizó el ensayo de BRET en condiciones de saturación del dador de energía (Figura 25 C). En este contexto, cabe recordar que el cociente aceptor/dador constituye uno de los factores que afectan la señal de BRET (Bacart, Corbel y col. 2008) y por lo tanto, el aumento de la señal mediado por un modulador positivo podría ser “diluido” por la presencia de moléculas libres del dador de energía, especialmente cuando el sistema se encuentra dentro del rango dinámico de la curva de saturación del dador de energía, donde no todas las moléculas del dador interactúan con el aceptor (Couturier and Deprez 2012). No obstante, en una condición de saturación del dador de energía, todos los sitios de dador se ocupan con el aceptor y

consecuentemente, sería posible contrarrestar el efecto “diluyente”. Si bien esta condición no es apropiada para un rastreo de inhibidores dado que, como ya se mencionó, podría derivar en la titulación de un potencial inhibidor, consideramos que resulta adecuada para un rastreo de moléculas moduladoras positivas.

Las interacciones proteína-proteína se pueden distinguir, entre otros factores, en base al tiempo de vida de sus complejos; a diferencia de una interacción permanente, la cual es usualmente muy estable y solo existe en su forma acomplejada, una interacción transitoria se asocia y disocia *in vivo* (Nooren and Thornton 2003). La interacción entre las proteínas p14 y Sf3b155 es un ejemplo de una interacción transitoria; estas proteínas constituyen intermediarios de vida corta que forman parte de un complejo dinámico que se ensambla y desensambla secuencialmente, a medida que ocurre la reacción de *splicing* (Avila, Bercovich y col. 2007). En este contexto, la asociación y disociación de la interacción posee un rol importante en la biología del complejo y por lo tanto, es posible suponer que una alteración en el equilibrio normal de la reacción podría derivar en consecuencias perjudiciales para la célula; en este sentido, un aumento en la afinidad de las proteínas interactuantes con la consecuente estabilización de dicha interacción, podría también constituir una buena estrategia para el descubrimiento de futuras drogas terapéuticas. Teniendo esto en consideración y en base a los resultados obtenidos, se reformuló la hipótesis original de trabajo, postulando que la modulación positiva de la interacción p14/Sf3b155 por compuestos capaces de desplazar el equilibrio de la reacción hacia la formación del complejo interactuante, podría derivar en propiedades antiparasitarias. No obstante, no se puede descartar que el aumento en la señal BRET se deba a un acercamiento entre las proteínas interactuantes, sin que esto tenga una implicancia biológica.

Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos enfocados en el descubrimiento de compuestos cuyo blanco de acción son IPPs volcaron sus esfuerzos en la búsqueda de inhibidores; sin embargo, en los últimos años se produjo un aumento en el interés por moléculas estabilizadoras, especialmente aquellas capaces de fortalecer una interacción natural mediante la unión a la superficie del complejo de interacción. Al igual que los inhibidores, las moléculas estabilizadoras presentan dos modos generales de acción (Thiel, Kaiser y col. 2012, Fischer, Rossmann y col. 2015): la estabilización alostérica, cuando una molécula se une a una de las proteínas y provoca un cambio en la superficie de interacción que deriva en un aumento en la afinidad de unión de la segunda proteína, o bien, la estabilización ortostérica o directa, cuando una molécula actúa a nivel de la superficie de interfase de una interacción establecida, aumentando la afinidad de unión de las proteínas interactuantes.

Una de las ventajas de las moléculas capaces de estabilizar un complejo proteína-proteína, y que aumenta su atractivo como potenciales drogas terapéuticas, reside en el hecho de que la unión a sus blancos ocurre de forma no competitiva; de esta manera, la afinidad de la unión no requiere encontrarse en rangos bajos de concentración, como en el orden nanomolar, para provocar un efecto fisiológico (Thiel, Kaiser y col. 2012). Existen numerosos ejemplos de moléculas estabilizadoras de IPPs, de origen natural, que se utilizan como drogas terapéuticas. Entre ellos se encuentran la Rapamicina y FK506, compuestos aislados de *Streptomyces* (Sehgal, Baker y col. 1975, Kino, Hatanaka y col. 1987), que poseen una potente actividad inmunosupresora y son indicados en el tratamiento de pacientes trasplantados (Giordanetto, Schafer y col. 2014). En ambos casos, los compuestos actúan de manera ortostérica sobre su interacción blanco (Giordanetto, Schafer y col. 2014, Fischer, Rossmann y col. 2015). Por otra parte, la Forskolina, aislada de *Coleus forskohlii* (SV Bhat 1977), compuesto cardioactivo y reductor de la presión arterial (Thiel, Kaiser y col. 2012) y el Paclitaxel, aislado de *Taxus brevifolia*, fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer (Wani, Taylor y col. 1971), representan ejemplos de compuestos que actúan a través de la estabilización de sus respectivas IPPs blanco de modo alostérico (Thiel, Kaiser y col. 2012, Fischer, Rossmann y col. 2015). Estos ejemplos, sumados a muchos otros más, contribuyen a reforzar el concepto de que la estabilización de una IPP puede ser utilizada como una estrategia prometedora para el descubrimiento de drogas terapéuticas.

La posibilidad de que el efecto del extracto de *Nardophyllum bryoides* fuera ejercido a nivel de la interfase que se genera entre Rluc y EYFP como consecuencia de la interacción entre las proteínas p14 y Sf3b155, fue descartada debido a que el extracto no provocó un aumento en la señal de BRET para la interacción U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹-Rluc/EYFP-SF1, donde también se forma una interfase Rluc/EYFP (Figura 26). Este resultado constituye un fuerte indicio de que el extracto actuaría a nivel de la interfase específica p14/Sf3b155 y además, en conjunto con los controles de emisión del dador y aceptor de energía, en los que se descartaron resultados falsos positivos (Figura 24 A y B), refuerza la idea de que el extracto de *Nardophyllum bryoides* contendría compuestos capaces de estabilizar el complejo p14-Sf3b155.

En busca de información acerca de la naturaleza química del compuesto modulador se descartó que el efecto fuera ejercido por una fracción rica en ácido secochiliolídico (Figura 27 C), un compuesto con actividad antiparasitaria (Siless, Lozano y col. 2013), del cual se desconoce su mecanismo de acción. En base a este resultado, es posible plantear que el efecto fuera ejercido por compuestos del tipo de los flavonoides, los cuales no están

presentes en la fracción analizada. Si bien estos compuestos tienen un comportamiento ácido y se extraen por extracción ácido-base junto con el ácido secochiliolídico, durante el posterior fraccionamiento, a través de permeación por Sephadex LH-20, se separan debido a su tamaño y a las interacciones diferenciales que establecen con la resina como consecuencia de su estructura aromática (Siless, Lozano y col. 2013). Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas y muchos de ellos presentan propiedades antiparasitarias, por ejemplo: la luteolina, quercetina, isoorientina y la flavona A, presentaron actividad antileishmania *in vitro*; la pinocembrina, crisina y la 7-metiluteolina, mostraron actividad moderada contra trypomastigotes sanguíneos de *T. brucei*; la 3-metilquercetina, 3,6-dimetilquercetina, 7,3-dimetiluteolina y la 3,6,7,3-tetrametilquercetina, presentaron actividad débil contra trypomastigotes de *T. cruzi* (Lee and Schneider 2001).

Otros compuestos interesantes, pero que quedan excluidos de la fracción analizada al realizar la extracción ácido-base, son los triterpenos pentacíclicos, que presentan un comportamiento de compuestos neutros (Sanchez, Mazzuca y col. 2010). Al igual que con los flavonoides, numerosos trabajos reportaron actividad antiparasitaria para estos compuestos. Algunos ejemplos representativos son la simalicalactona D, la isoiguesterina y la 20-epi-isoiguesterinol, potentes compuestos antileishmania (Lee and Schneider 2001); interesantemente, el uvaol, triterpeno pentacíclico presente en *Nardophyllum bryoides* (Sanchez, Mazzuca y col. 2010), presentó actividad moderada antileishmania (da Silva Filho, Resende y col. 2009) y anti *T. brucei* y *T. cruzi* (Taketa, Gnoatto y col. 2004).

Si bien es posible que los flavonoides o los triterpenos pentacíclicos sean responsables del efecto observado sobre la interacción blanco, y nos propusimos incluirlos en análisis futuros, no se descarta que el efecto del extracto crudo de *Nardophyllum bryoides* ocurra como consecuencia de un sinergismo que se pierde durante el proceso de purificación.

La interrupción de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo debido a la presencia del extracto de *Nardophyllum bryoides*, así como la dificultad para restaurar el crecimiento a concentraciones crecientes del mismo (Figura 28), constituye una evidencia de que el extracto presenta propiedades antiparasitarias y que podría utilizarse como una fuente de compuestos base para el desarrollo de drogas terapéuticas para la Enfermedad de Chagas. Bajo esta premisa, se analizó la toxicidad del extracto sobre células humanas, observando una $IC_{50} = 54,14 \mu\text{g/ml}$ (Figura 29). Si bien con 20 y 100 $\mu\text{g/ml}$ se observó un efecto antiparasitario (Figura 28), el cálculo de la IC_{50} nos lleva a inferir que la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ presentaría una elevada toxicidad sobre células humanas y por lo tanto, no sería apropiada su utilización. De todos modos, es altamente probable que una vez que se

logre detectar y purificar el compuesto responsable del efecto, se podrá alcanzar la misma actividad a una concentración inferior, reduciendo consecuentemente, los efectos tóxicos sobre las células humanas.

Contrariamente al objetivo original de encontrar extractos con efecto inhibitorio sobre una interacción entre proteínas de *T. cruzi*, a fin de utilizarlos como fuente de compuestos antiparasitarios, detectamos que un extracto de *Nardophyllum bryoides* presentó la capacidad de aumentar la señal de la interacción Sf3b155/p14. Dado que la modulación positiva de una interacción esencial podría implicar un cambio en su vida media, y repercutir en la homeostasis del parásito, profundizamos el estudio de las características del extracto y observamos que el mismo presentó propiedades antiparasitarias. En base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que *Nardophyllum bryoides* es una especie local, ampliamente distribuida en la Patagonia argentina (Bonifacio 2005) y que constituye una fuente biológica sustentable (Sanchez, Mazzuca y col. 2010), consideramos que un estudio más profundo del mecanismo de acción del extracto de *Nardophyllum bryoides* sobre la interacción p14/Sf3b155, podría aportar importantes beneficios para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Capítulo II

**Búsqueda de nuevos blancos
moleculares para la terapia de la
Enfermedad de Chagas:
proteínas que contienen dominios WW**

Introducción

1. Generalidades de las proteínas que contienen dominios WW

Los dominios WW son pequeños módulos proteicos que abarcan 30-40 residuos y median interacciones proteína-proteína a través del reconocimiento de motivos peptídicos ricos en prolina (Kay, Williamson y col. 2000). Una de las características distintivas y que le otorga su nombre es la presencia de dos residuos triptofano (W), altamente conservados y espaciados entre sí por 20-23 aminoácidos, que ejercen un rol central en la estructura y función del dominio (Bork and Sudol 1994). Exclusivos de eucariotas, se los puede hallar en proteínas estructurales y de señalización, involucradas en una amplia variedad de procesos celulares que incluyen la transcripción y el procesamiento del ARN, el tráfico y la estabilidad de proteínas, la señalización mediada por receptores y el control del citoesqueleto, entre otros (Kay, Williamson y col. 2000, Ingham, Colwill y col. 2005). Consecuentemente, las proteínas que contienen dominios WW se encuentran distribuidas en numerosos contextos subcelulares y redes metabólicas.

La disfunción de complejos de señalización en los que interviene este tipo de proteínas se relaciona de manera directa o indirecta con varias patologías humanas como el síndrome de hipertensión de Liddles, la distrofia muscular, la enfermedad de Alzheimer y de Huntington y el cáncer (Macias, Wiesner y col. 2002); por esta razón, las proteínas que contienen dominios WW resultan blancos moleculares atractivos para nuevos diagnósticos y terapias. Hasta la actualidad, se determinaron mapas detallados de interacciones WW en humanos y levaduras. Existen 64 proteínas con dominios WW en humanos, que interactúan con cientos de proteínas que intervienen en distintos procesos celulares (Hu, Columbus y col. 2004, Ingham, Colwill y col. 2005); y 10 proteínas en levaduras, que totalizan 13 dominios WW y que interactúan con 207 proteínas con motivos ricos en prolina (Hesselberth, Miller y col. 2006). De esta forma, unas pocas proteínas con dominios WW son capaces de unir cientos de proteínas diferentes, sirviendo de plataforma para el ensamblado de redes multiproteicas que transducen señales y funcionan en diversos procesos metabólicos dentro de la célula (Ingham, Colwill y col. 2005).

2. Identificación y clasificación de los dominios WW

Los dominios WW fueron identificados por primera vez en la isoforma murina de la proteína YAP y en el factor Rsp5 de levaduras (Sudol 1996). Mediante el rastreo de

bibliotecas de ADNc se identificaron dos ligandos putativos, WBP-1 y -2, ambos con regiones ricas en prolina, que unen de manera específica el dominio WW de la proteína YAP humana (Chen, Einbond y col. 1997). En base al análisis de las secuencias de los ligandos se estableció el motivo XPPXY (donde, X representa cualquier aminoácido; P, prolina; e Y: tirosina), como secuencia consenso preliminar, necesaria para la unión de los dominios WW (Chen, Einbond y col. 1997). Poco tiempo después, se resolvió por cristalografía la estructura del regulador mitótico Pin1 (Ranganathan, Lu y col. 1997) y en el año 1999, Rentschler, S., y col. determinaron la estructura del dominio WW de la proteína distrofina, en complejo con su ligando, el motivo PPXY del β -dístroglicano y se estableció que la interferencia de esta interacción podía resultar en la distrofia muscular de Duchenne o Becker (Rentschler, Linn y col. 1999).

Actualmente, se conocen cinco tipos de dominios WW, clasificados en base a la preferencia por su ligando (Tabla 4) (Macias, Hyvonen y col. 1996, Sudol 1996, Chen, Einbond y col. 1997, Sudol and Hunter 2000, Otte, Wiedemann y col. 2003). Para la clasificación, se consideraron las secuencias de los dominios WW y resultados de rastreos con bibliotecas de péptidos ricos en prolinas (Kay, Williamson y col. 2000, Kato, Ito y col. 2002, Otte, Wiedemann y col. 2003, Kato, Nagata y col. 2004, Peng, Zintsmaster y col. 2007).

Grupo	Motivo reconocido
I	(L/P)Pp(Y/fosfo-Y)
II	PPLPp
III	(p/f)P(p/g)PPpR y (P/f)PP(R/K)gpPp
IV	(fosfo-S/fosfo-T)P
V	(p/f)PPPPP

Tabla 4. Clasificación de los dominios WW según la especificidad por sus ligandos. P: prolina; L: leucina; Y: tirosina; F: fenilalanina; G: glicina; S: serina; T: treonina; R: arginina; fosfo-: residuo fosforilado; letras en minúscula: residuos favorecidos, pero no altamente conservados. Adaptado de Salah, Z., y col. (2012).

Los dominios del grupo I, que reconocen motivos (L/P)Pp(Y/fosfo-Y), constituyen la mayor clase de proteínas con dominios WW e incluyen una gran variedad de moléculas de señalización como YAP, WWOX ITCH, entre otras (Chen, Einbond y col. 1997, Linn, Ermekova y col. 1997, Bednarek, Laflin y col. 2000, Ingham, Gish y col. 2004, Melino, Gallagher y col. 2008). Para la mayoría de los casos, se propuso que la fosforilación en tirosina del motivo PPxY podría ejercer un efecto regulatorio que afectaría la afinidad de la unión a estos dominios; por ejemplo, la fosforilación en tirosina del motivo PPxY del β -dístroglicano provoca la interrupción de la interacción con la proteína distrofina (Ilsley, Sudol y col. 2001).

Los dominios WW del grupo II unen específicamente proteínas que contienen el motivo PPLPp; la proteína de unión a formina, FBP-11, representa un ejemplo de este tipo de dominio (Bedford, Reed y col. 1998).

Los miembros que pertenecen al grupo III unen segmentos ricos en PR y pueden dividirse en dos subgrupos independientes de acuerdo al motivo específico que son capaces de reconocer (Tabla 4); como representantes de cada subgrupo se incluyen las proteínas FE65 y FBP21 (Otte, Wiedemann y col. 2003). Resulta interesante remarcar que los grupos II y III pueden ser unificados (grupo II/III) debido a que las preferencias por sus ligandos y propiedades cinéticas son casi indistinguibles (Kato, Nagata y col. 2004).

Las proteínas con dominios WW del grupo IV, por ejemplo Pin1, unen residuos prolina que se encuentran precedidos por una serina o treonina fosforiladas, siendo generalmente más fuerte la unión a motivos que contienen fosfotreonina (Lu, Zhou y col. 1999, Verdecia, Bowman y col. 2000, Otte, Wiedemann y col. 2003).

Por último, los dominios WW del grupo V, por ejemplo los dos dominios WW repetidos en tándem de la proteína de unión a la ARN polimerasa 2 de levaduras, Prp40, reconocen secuencias ininterrumpidas de poliprolinas, en las que el primer residuo debe ser hidrofóbico (Otte, Wiedemann y col. 2003).

3. Estructura de los dominios WW

Los dominios WW representan los módulos proteicos de ocurrencia natural más pequeños que existen y debido a su implicancia en enfermedades humanas se encuentran muy bien caracterizados. En el espacio, se pliegan de manera estable en ausencia de cofactores o puentes disulfuro y adoptan una estructura globular compacta, constituida por tres hojas- β antiparalelas (Ibragimova and Wade 1999). Los dos triptofanos conservados se localizan en

caras opuestas de las hojas- β . Uno de ellos, se localiza en el extremo N-terminal y forma una estructura en forma de “gancho”, que se encuentra estabilizada por contactos entre dicho residuo y una prolina muy conservada, que lo precede por 3-4 aminoácidos (Figura 30 A); esta región, forma parte de un surco hidrofóbico extendido, que incluye al extremo C-terminal del dominio (Jager, Nguyen y col. 2001, Jager, Nguyen y col. 2007). La unión al motivo X-P, presente en todo sustrato rico en prolina, se estabiliza a través del surco hidrofóbico y es mediada por un triptófano del extremo C-terminal de la hoja- β 3 y un residuo aromático, típicamente tirosina o fenilalanina, presente en la hoja- β 2 (Salah, Alian y col. 2012). Interesantemente, el dipéptido X-P, es capaz de unirse al dominio en orientación N- o C-terminal. En particular, en los dominios WW del grupo I, la unión al ligando es coordinada por el triptófano del extremo C-terminal a través de la formación de enlaces de Van der Waals con las dos prolinas conservadas del motivo PPxY y a su vez, una histidina conservada coordina, por medio de un puente de hidrógeno, la unión a la tirosina terminal del ligando, la cual se ajusta dentro el bolsillo hidrofóbico (Figura 30 B) (Kay, Williamson y col. 2000, Kato, Ito y col. 2002, Hu, Columbus y col. 2004, Kato, Nagata y col. 2004).

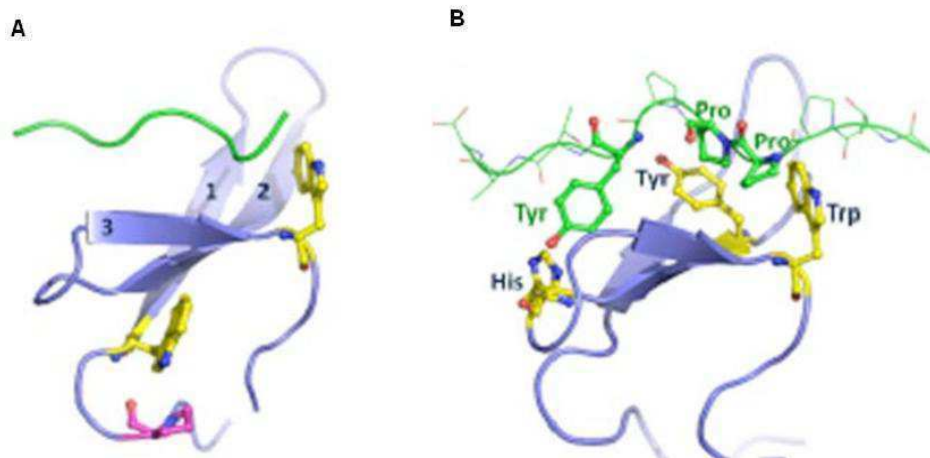


Figura 30. Estructura de los dominios WW. (A) Representación esquemática de un dominio WW basada en la cristalografía de Pin1. Se enumeran las tres hojas- β y se muestran los residuos conservados triptofano (amarillo) y prolina (magenta); el ligando se muestra en forma de lazo verde. **(B) Representación esquemática de la unión de un dominio WW del grupo I y un ligando con motivo PPxY.** La unión al residuo tirosina (verde, Tyr) del ligando es coordinada por una histidina (amarillo, His) presente en el dominio WW. Las prolinas del ligando (verde, Pro) se ajustan en el surco hidrofóbico y son estabilizadas por un triptófano presente en el C-terminal del dominio (amarillo, Trp) y una tirosina (amarillo, Tyr). Adaptado de Salah, Z., y col. (2012).

Sobre la superficie del surco hidrofóbico, los dominios WW poseen dos lazos (*loops*), variables en su secuencia, que separan las tres hojas- β entre sí: el *loop* I, presente entre la hoja- β 1 y - β 2 y el *loop* II, entre la hoja- β 2 y - β 3 (Figura 31). A través de estos lazos, y de regiones vecinas al surco hidrofóbico, se determina la especificidad por los ligandos. En algunos casos, dominios vecinos presentes en la propia proteína pueden determinar la estabilidad de la interacción, por ejemplo, la interacción entre la distrofina y el β -dístroglicano requiere tanto del dominio WW como del dominio adyacente, EF, capaz de unir Ca^{+2} (Zarrinpar and Lim 2000, Zarrinpar, Bhattacharyya y col. 2003).

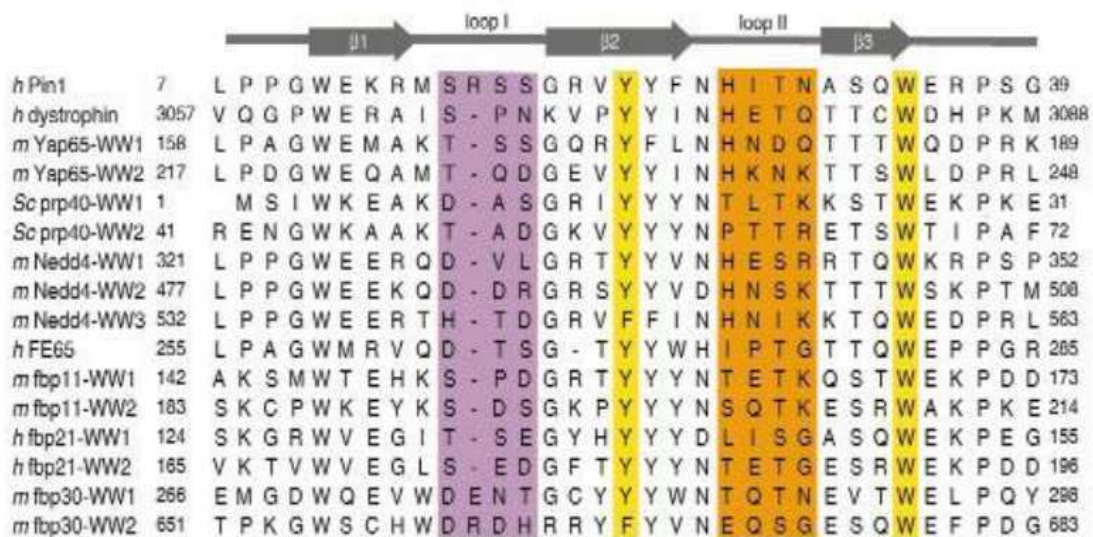


Figura 31. Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas con dominios WW de distintos organismos. Se resaltan los residuos aromáticos conservados que conforman el surco hidrofóbico (amarillo), y los residuos variables de los lazos I y II (violeta y naranja, respectivamente). Adaptado de Zarrinpar, A., y Lim, W. (2000).

4. Identificación y clasificación de proteínas que contienen dominios WW en *T. cruzi*

En *T. cruzi* se encuentran anotadas 21 proteínas que contienen dominios WW, halladas a través del rastreo del proteoma deducido del genoma del parásito (Reinert 2011). Eliminada la redundancia correspondiente a la característica híbrida del genoma de la cepa secuenciada, CL Brener, se redujo a 11 proteínas diferentes, que totalizan 17 dominios WW (Tabla 5); entre las 11 proteínas, hay 3 con funciones asignadas como putativas y 8 son proteínas hipotéticas, según lo detallado en la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/>). Mediante la utilización de la herramienta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) se

identificó la cantidad y posición de los dominios WW, observando que algunas de las proteínas poseen hasta 4 dominios WW en tándem y presentan dominios adicionales de ATPasa, de unión a citoesqueleto de actina o de dedo de zinc (Tabla 5).

Interesantemente, la mayoría de las proteínas con dominios WW que se identificaron no tienen ortólogos en otros eucariotas, sugiriendo que podrían cumplir funciones específicas de trypanosomátidos; por ejemplo, las combinaciones de dominios de unión a actina y WW y dedo de zinc y WW, son exclusivas de estos organismos. Por otro lado, 4 de estas proteínas no tienen ortólogos en el resto de los trypanosomátidos (WW06, WW08, WW12 y WW19), y son, por lo tanto, específicas de *T. cruzi* (Reinert 2011).

Nombre asignado	Nro. de acceso (TrytripDB)	Función	Cantidad de dominios WW	Dominios adicionales
WW06*	TcCLB.506363.60	Subunidad β de la proteína de unión a actina, putativa	1	Unión a actina
WW08*	TcCLB.503891.90	Proteína hipotética	1	-
WW09	TcCLB.506573.60	Proteína hipotética, conservada	4	-
WW12*	TcCLB.504427.180	Proteína hipotética	3	-
WW14	TcCLB.510889.270	Proteína hipotética, conservada	1	-
WW16	TcCLB.507527.20	Proteína hipotética, conservada	1	-
WW17	TcCLB.507087.70	Proteína hipotética, conservada	1	ATPasa
WW19*	TcCLB.507739.110	Cadena pesada IB de miosina, putativa	1	ATPasa
WW21	TcCLB.511661.10	Proteína hipotética, conservada	2	-
ZFP2B	TcCLB.509231.39	Proteína hipotética, conservada	1	Dedo de zinc
ZFP2A	TcCLB.401469.10	Proteína dedo de zinc 2, putativa	1	Dedo de zinc

Tabla 5. Proteínas que contienen dominios WW en *T. cruzi*. Se indica con asterisco aquellas proteínas que no tienen ortólogos en el resto de los trypanosomátidos. Adaptado de Reinert, M. (2011).

El alineamiento múltiple secuencias de las proteínas con dominios WW demostró la presencia de residuos conservados, como triptofano y tirosina, en los 17 dominios WW de *T. cruzi* (Figura 32).

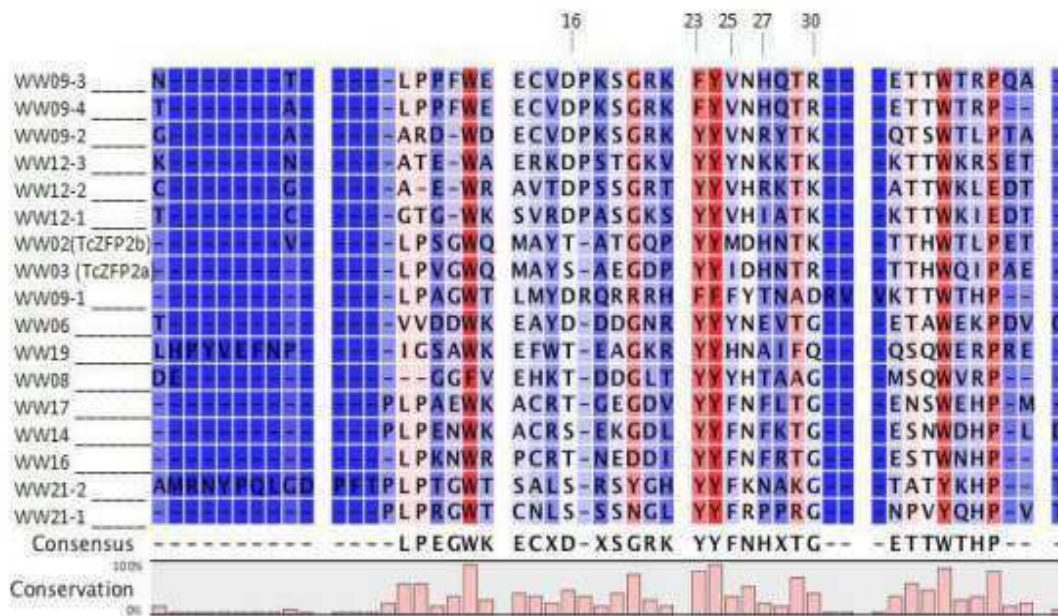


Figura 32. Alineamiento múltiple de secuencias para los 17 dominios WW de *T. cruzi*. Se detallan los aminoácidos conservados y el porcentaje de conservación. Los dos residuos W característicos de estos dominios se resaltan en rojo. Adaptado de Reinert, M. (2011).

Mediante el análisis de las secuencias y los consensos característicos de cada grupo (Salah, Alian y col. 2012), los dominios WW de *T. cruzi* se agruparon putativamente en la siguiente tabla:

Grupo	Proteínas
I	ZFP2A, ZFP2B, WW09 (2, 3 y 4), WW12 (1 y 2)
II/III	WW06, WW08, WW12 (3), WW17, WW19
IV	WW14, WW16, WW21
Indeterminado	WW09 (1)

Tabla 6. Clasificación de los dominios WW de *T. cruzi*. El dominio WW-1 de la proteína putativa WW09 no pudo ser ubicado en ninguno de los 5 grupos y quedó indeterminado. Adaptado de Reinert, M. (2011).

La identificación *in silico* de proteínas con dominios WW fue confirmada en parte a través de ensayos preliminares realizados en nuestro laboratorio. Específicamente, se detectó la expresión endógena de las proteínas WW06 y WW08, exclusivas de *T. cruzi*, en extractos proteicos de parásitos del estadio epimastigote y en ensayos de inmunofluorescencia indirecta con parásitos del mismo estadio. Asimismo, trabajos previos identificaron las proteínas TcZFP2A y TcZFP2B (Caro, Bercovich y col. 2005).

5. Identificación de ligandos de proteínas que contienen dominios WW en *T. cruzi*

En busca de ligandos putativos para las proteínas con dominios WW se rastreó la base de datos de proteínas predichas a partir del genoma de *T. cruzi*, cepa CL Brener, por medio de expresiones regulares de los motivos ricos en prolina. La expresión (fosfo-S/fosfo-T)P del grupo IV, no se incluyó en la búsqueda debido a que no fue posible rastrearla bioinformáticamente. Como resultado, se encontraron 20 ligandos putativos de dominios WW del grupo I, 26 del grupo II, 6 del grupo III y ninguno del grupo V (Reinert 2011). La identificación *in silico* de estas proteínas, en combinación con la clasificación putativa de los dominios WW de *T. cruzi* (Tabla 6), permite realizar predicciones sobre potenciales interacciones entre proteínas con dominios WW y proteínas con motivos ricos en prolina.

Hasta la fecha, las únicas interacciones validadas experimentalmente en *T. cruzi* corresponden a las proteínas ZFPs. A través de ensayos de doble híbrido en levaduras, trabajos previos demostraron que las proteínas pequeñas TcZFP2A y TcZFP2B, que poseen un motivo dedo de zinc y un dominio WW del grupo I, interactúan en forma cruzada con otras dos proteínas pequeñas: TcZFP1A y TcZFP1B, que contienen un motivo PPxY. Mediante mutaciones puntuales en los residuos conservados triptofano y tirosina, presentes en los dominios WW, se demostró que estos dominios son los responsables de mediar las interacciones mencionadas (Caro, Bercovich y col. 2005).

6. Hipótesis y objetivo general

Considerando que los dominios WW sirven de plataforma para el ensamblado de redes multiproteicas que transducen señales y funcionan en diversos procesos celulares, teniendo en cuenta que la presencia de estos dominios en *T. cruzi* sugiere la existencia de redes similares en el parásito y sumado a que la mayoría de las proteínas que contienen dominios WW en *T. cruzi* no tienen ortólogos en otros eucariotas, el armado de mapas de

interacciones de proteínas que contienen dominios WW podría presentar numerosos blancos moleculares atractivos para el desarrollo de nuevas drogas antiparasitarias.

En particular, nos enfocamos en el estudio de una proteína hipotética, TcCLB.504427.180 (WW12), que posee 3 dominios WW y es exclusiva de *T. cruzi*. El objetivo principal consistió en la búsqueda de pares de interacción de la proteína, a fin de contribuir a la caracterización de nuevos blancos terapéuticos.

Resultados

1. Caracterización bioquímica de la proteína WW12 de *T. cruzi*

Se realizó una caracterización general de la proteína WW12 a fin de complementar la información obtenida de una búsqueda *in silico* de proteínas que contienen dominios WW en *T. cruzi* (Reinert 2011). Para ello, se generaron anticuerpos policlonales específicos que posibilitaron el estudio de la expresión de WW12 durante el ciclo de vida del parásito y la determinación de su localización subcelular. Este objetivo fue de especial importancia debido a que permitió obtener información necesaria para la búsqueda de pares de interacción de WW12.

1.1. Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína WW12

Para la producción de anticuerpos policlonales contra la proteína WW12 se subclonó la región que corresponde a los residuos 1-213 en fusión a un *tag* de histidinas (pDESTTM17); esta región, excluyó los 3 dominios WW de manera de evitar la obtención de anticuerpos que presenten un reconocimiento cruzado con otras proteínas con dominios WW.

Por medio de la inducción con IPTG durante distintos intervalos de tiempo se determinó el tiempo óptimo de inducción de la proteína recombinante His-WW12¹⁻²¹³ (PM: 26,4 kDa) en bacterias *E. coli*, cepa BL21. La proteína se detectó a partir de 1 hora postinducción, con un máximo nivel de expresión a las 4 horas que se mantuvo durante el resto del ensayo (Figura 33 A). En base a este resultado, las inducciones posteriores se realizaron durante 4 horas. A fin de obtener cantidades suficientes para la inmunización de ratones, la proteína His-WW12¹⁻²¹³ se expresó en cultivos de mayor volumen y se purificó en condiciones desnaturizantes con una resina de agarosa Ni-NTA (Figura 33 B); asimismo, se corroboró su identidad por medio de un ensayo de Western blot (Figura 33 C).

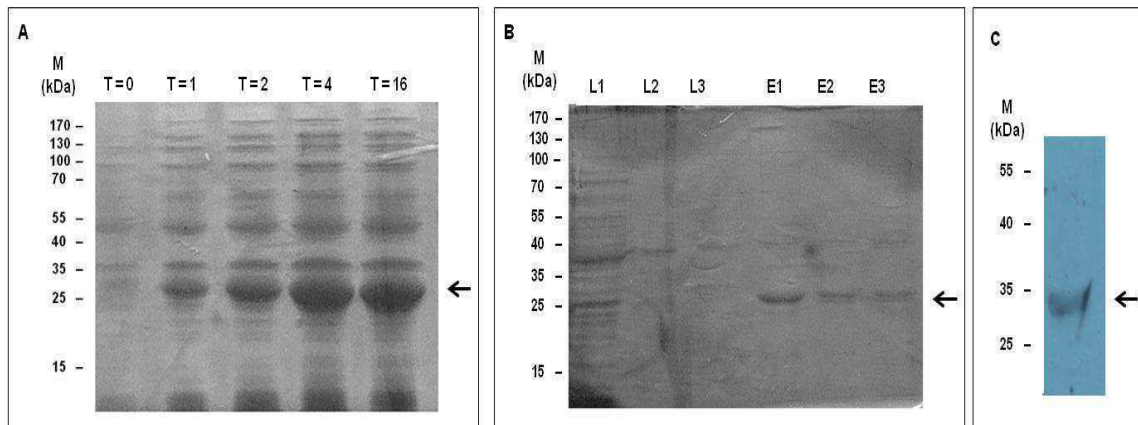


Figura 33. Expresión de la proteína recombinante His-WW12¹⁻²¹³. (A) Prueba piloto de expresión. Un cultivo de 20 ml bacterias BL21, transformadas con pDEST17+WW12¹⁻²¹³, se indujo con ITPG 1 mM durante 0, 1, 2, 4 y 16 horas. Se analizó la expresión de His-WW12¹⁻²¹³ en lisados bacterianos por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie. T: tiempo de inducción (horas). (B) Expresión a gran escala y purificación. Un cultivo de 100 ml de bacterias BL21, transformadas con pDEST17+WW12¹⁻²¹³, se indujo con ITPG 1 mM durante 4 horas a 37 °C. Se purificó la proteína recombinante con una resina de agarosa Ni-NTA por medio de 3 eluciones con imidazol 500 mM. Se analizó la expresión de His-WW12¹⁻²¹³ en alícuotas de los lavados (L) y eluidos (E) por SDS-PAGE 10% y tinción de azul de Coomassie. (C) Verificación de la identidad de la proteína purificada. Se concentraron los tres eluidos de la purificación y se analizó la presencia de His-WW12¹⁻²¹³ por Western blot con un anticuerpo anti tag de histidinas (dilución 1/1.000). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína His-WW12¹⁻²¹³. M: marcador de PM.

A través de un ensayo de Dot blot se evaluó la presencia de anticuerpos específicos en los sueros de 3 ratones inmunizados con la proteína His-WW12¹⁻²¹³; como control negativo se utilizó la proteína BSA y los sueros preinmunización.

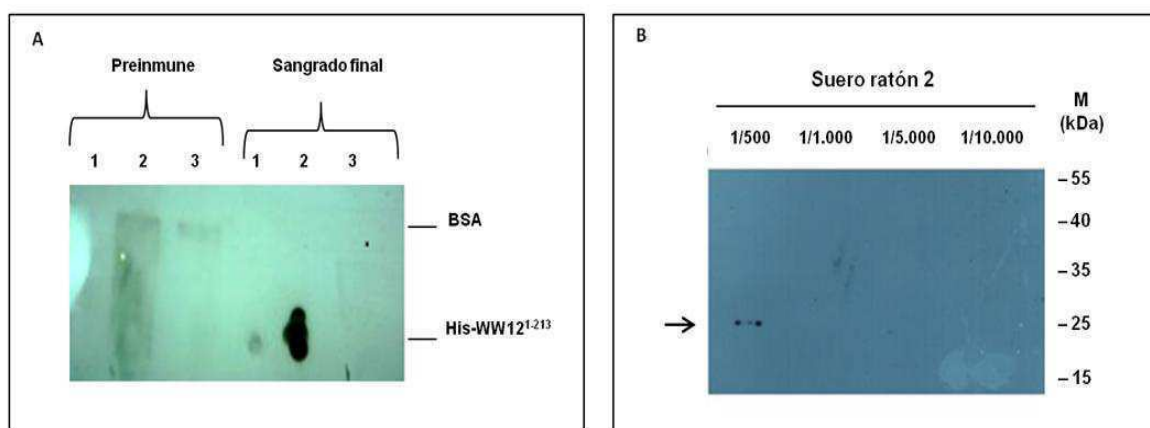


Figura 34. Caracterización de los sueros obtenidos de la inmunización con la proteína His-WW12¹⁻²¹³. (A) Presencia de anticuerpos contra la proteína recombinante. Se realizó un ensayo de Dot blot con 300 ng de las proteínas His-WW12¹⁻²¹³ y BSA. Se incubaron las membranas con una dilución 1/500 de los sueros de los

ratones 1-3, preinmunes o inmunizados con la proteína His-WW12¹⁻²¹³. **(B) Titulación del suero del ratón 2.** Se realizó un ensayo de Western blot con 150 ng de la proteína His-WW12¹⁻²¹³ y se evaluaron distintas diluciones del suero. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína His-WW12¹⁻²¹³. M: marcador de PM.

Los sueros de los ratones 1 y 2 fueron capaces de detectar la proteína recombinante His-WW12¹⁻²¹³, pero la señal del suero del ratón 2 fue significativamente más elevada. Asimismo, no reconocieron la proteína BSA, ni se observó señal con los sueros preinmune. Se descartó el suero proveniente del ratón 3 debido a que no reconoció la proteína recombinante (Figura 34 A).

Se tituló el suero proveniente del ratón 2 y se observó una banda correspondiente a His-WW12¹⁻²¹³ únicamente con una dilución 1/500 (Figura 34 B).

1.2. Expresión endógena de la proteína WW12 durante el ciclo de vida de *T. cruzi*

Se estudió la expresión endógena de WW12 (PM: 81,8 kDa) durante el ciclo de vida de *T. cruzi* en lisados celulares provenientes de parásitos en distintos estadios de diferenciación. La detección de la proteína en el estadio epimastigote, pero no en trypomastigote y amastigote, indica que la expresión de WW12 es estadio-específica (Figura 35). Las bandas de menor PM detectadas en el gel probablemente correspondan a productos de degradación de WW12, generados como consecuencia de las condiciones de lisis de los parásitos.

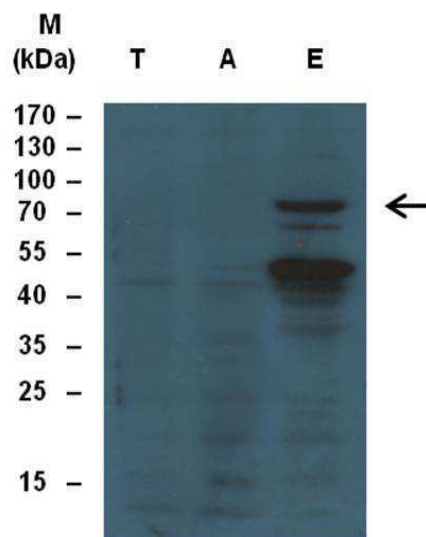


Figura 35. Expresión endógena de WW12 durante el ciclo de vida de *T. cruzi*. Se realizó un ensayo de Western blot con lisados de 4×10^7 parásitos en distintos estadios de diferenciación. Se incubó la membrana con el anticuerpo específico anti-WW12 (dilución 1/500). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína WW12. T: trypomastigotes; A: amastigotes; E: epimastigotes; M: marcador de PM.

1.3. Localización subcelular de la proteína WW12 en epimastigotes de *T. cruzi*

Se estudió la localización subcelular de la proteína WW12 endógena en parásitos del estadio epimastigote mediante una inmunofluorescencia indirecta. A pesar de que la señal específica para WW12 fue baja, se observó que la proteína parecería ubicarse en las cercanías del núcleo (Figura 36).

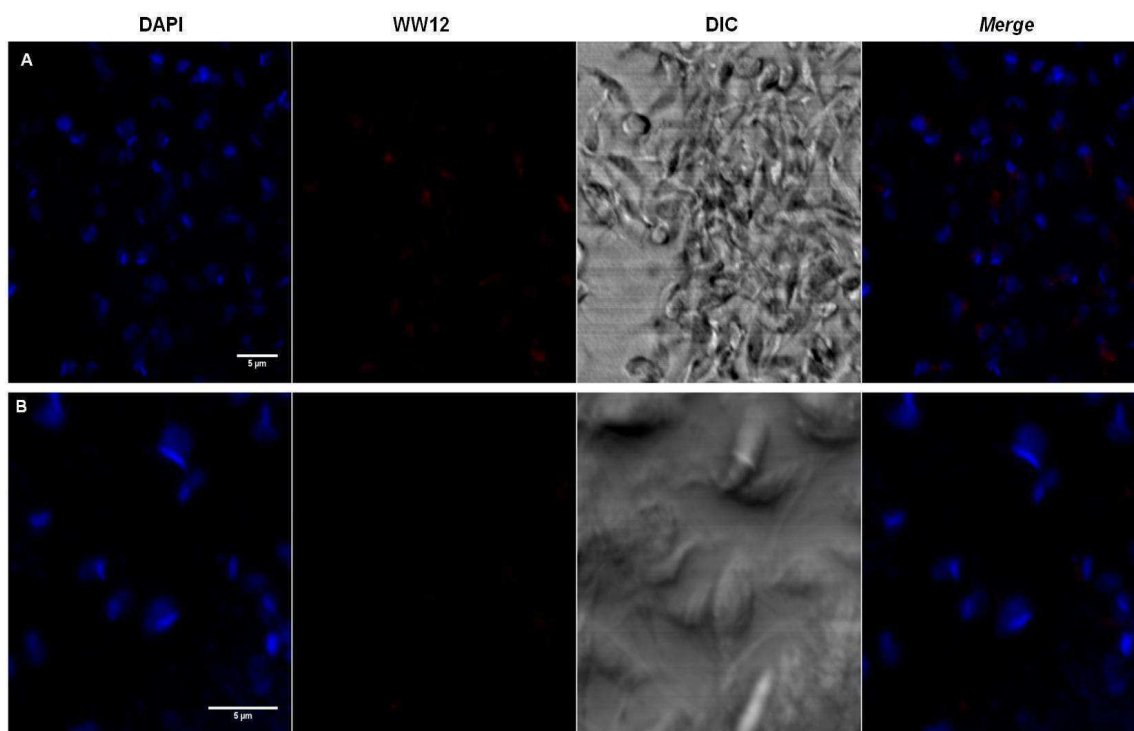


Figura 36. Localización de la proteína WW12 endógena en epimastigotes de *T. cruzi*. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con 1×10^6 epimastigotes de la cepa CL Brener. **(A)** Se incubó con el anticuerpo primario anti-WW12 (dilución 1/100). **(B)** Control negativo: se omitió la incubación con el anticuerpo primario. En ambos casos, se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, acoplado al fluoróforo Alexa-555 (dilución 1/1.000) y los núcleos se tiñeron con DAPI $1 \mu\text{g/ml}$. Las imágenes se obtuvieron por microscopía confocal. DIC: contraste de interferencia diferencial. Merge: superposición de DAPI con fluorescencia de Alexa-555. Aumento: 1000X.

2. Búsqueda de interacciones proteína-proteína para WW12

Con el fin de caracterizar nuevos blancos moleculares para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas se realizó una búsqueda de pares de interacción específicos para la proteína WW12. Se emplearon abordajes experimentales diferentes, lo cual permitió abarcar un amplio espectro de posibles ligandos.

2.1. Análisis de interacciones entre WW12 y proteínas que contienen motivos peptídicos ricos en prolina en *T. cruzi*

Se evaluó la presencia de interacción entre la proteína WW12 y ligandos putativos que contienen motivos ricos en prolina predichos *in silico* en trabajos previos (Reinert 2011). Teniendo en cuenta que en base a la especificidad por sus ligandos, los dominios WW-1 y -2 de la proteína WW12 fueron clasificados en el grupo I y el dominio WW-3, en el grupo II/III (Reinert 2011), los candidatos seleccionados para evaluar la existencia de interacción fueron los siguientes: TcCLB.511003.180 (PY154), TcCLB.508385.60 (PY293) y TcCLB.511571.20 (PY297), del grupo I y TcCLB.507143.80 (PL251), del grupo II/III.

Para el análisis, se expresaron los 4 ligandos putativos, cada uno fusionado a un *tag* de histidinas (His-PY297, PM: 34,1 kDa; His-PL251, PM: 32,3 kDa; His-PY154, PM: 20,5 kDa; His-PY293, PM: 34,8 kDa) y una región que contenía a los 3 dominios WW de la proteína WW12, en fusión a GST (GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³², PM: 47,9 kDa). Por cada posible interacción se realizó un ensayo de precipitación diferencial con una resina de agarosa-GSH.

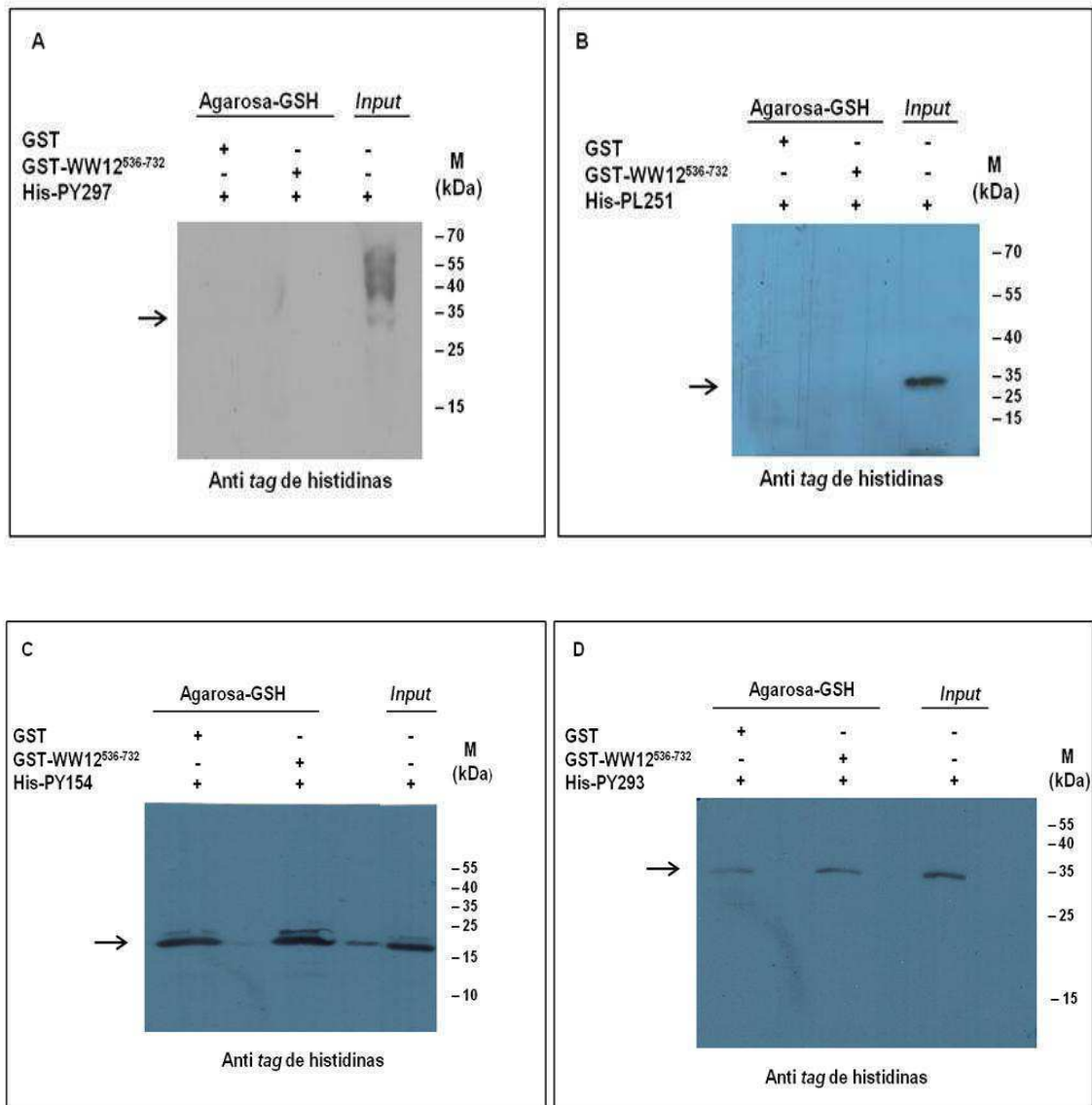


Figura 37. Estudio de interacciones entre la proteína WW12 y ligandos putativos que contienen motivos peptídicos ricos en prolina. Se realizaron ensayos de precipitación diferencial con 12,5 µg de la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² preconjugada a una resina de agarosa-GSH. Se analizó la capacidad de unir proteínas con motivos ricos en prolina presentes en lisados bacterianos. Como control, se preconjugó a la resina la proteína GST. Los resultados se analizaron por Western blot con un anticuerpo anti tag de histidinas (dilución 1/2.500). **(A)** Par GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PY297. **(B)** Par GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PL251. **(C)** Par GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PY154. **(D)** Par GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PY293. La flecha indica las bandas correspondientes a cada proteína con motivos prolina. M: marcador de PM.

A diferencia de lo predicho *in silico*, no se detectó interacción para los pares GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PY297 y GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PL251 (Figura 37 A y B, respectivamente). Para los otros pares de proteínas (GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PY154 y GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-

PY293), la banda correspondiente a los ligandos putativos en la calle del control (Figura 37 C y D, respectivamente) indica una unión inespecífica a la resina agarosa-GSH y por lo tanto, para verificar la presencia de interacción específica se realizaron ensayos de precipitación diferencial recíprocos con una resina de agarosa Ni-NTA. Al igual que para His-PY297 e His-PL251, la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² no fue capaz de unir las proteínas His-PY154 e His-PY293 (Figura 38).

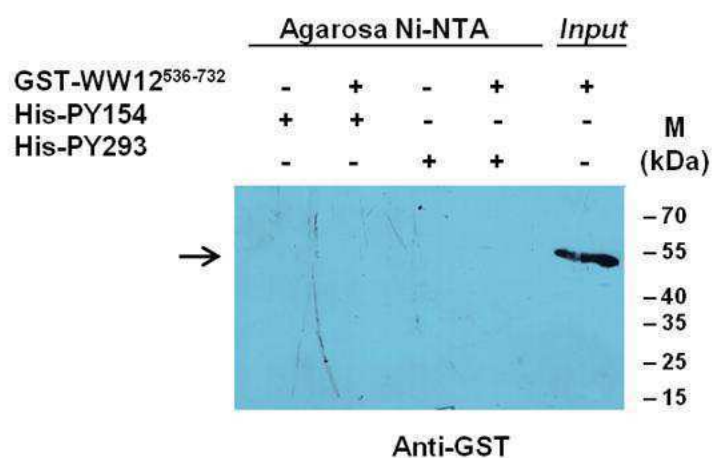


Figura 38. Estudio de interacciones entre la proteína WW12 y ligandos putativos que contienen motivos peptídicos ricos en prolina. Se realizaron ensayos de precipitación diferencial con las proteínas His-PY154 e His-PY293 preconjugadas a una resina de agarosa Ni-NTA. Se analizó la capacidad de unir la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² por Western blot con un anticuerpo anti-GST (dilución 1/2.500). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³². M: marcador de PM.

2.2. Búsqueda de pares de interacción para la proteína WW12 por rastreo de lisados de epimastigotes

Se realizó un ensayo de precipitación diferencial empleando como “carnada” a la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² preconjugada a una resina de agarosa-GSH y se rastreó un lisado de parásitos del estadio epimastigote (estadio en el que se expresa WW12), en busca de pares de interacción para WW12. Como control, se realizó el ensayo en ausencia del lisado de parásitos.

Como resultado del rastreo, además de una banda correspondiente a la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² se observó una banda de aproximadamente 25 kDa; teniendo en cuenta que dicha banda estaba ausente en el control, se descartó que corresponda a una proteína

inespecífica, proveniente de la expresión de GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² en bacterias, por lo que se consideró que podría corresponder a un interactor de WW12 (Figura 39).

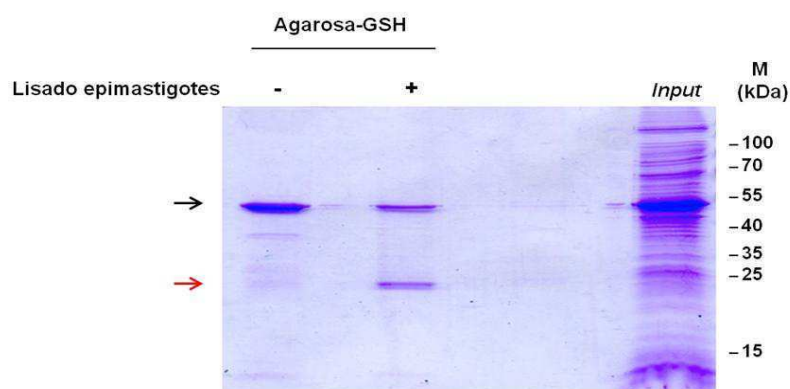


Figura 39. Búsqueda de pares de interacción para la proteína WW12 en un lisado de epimastigotes. Se realizó un ensayo de precipitación diferencial con 12,5 µg de GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³², preconjugada a una resina de agarosa-GSH y se analizó su capacidad de precipitar proteínas presentes en un lisado de 5×10^8 epimastigotes. Como control, se realizó el ensayo en ausencia del lisado de parásitos. Los resultados se analizaron por SDS-PAGE 10% y tinción con azul de Coomassie en suspensión coloidal. La flecha superior indica la banda correspondiente a la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² y la flecha inferior, la banda correspondiente a un posible interactor. M: marcador de PM.

Se removió del gel la banda del posible interactor de WW12 y se analizó su identidad por espectrometría de masa, en el Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay. El estudio por MALDI-TOF demostró que el péptido correspondía a la proteína GST.

2.3. Búsqueda de pares de interacción para la proteína WW12 por rastreo de una biblioteca de ADNc de epimastigotes

En busca de pares de interacción para la proteína WW12 se rastreó una biblioteca de ADNc de epimastigotes de *T. cruzi* con el sistema de doble híbrido en levaduras que, a diferencia del ensayo de precipitación diferencial, garantiza la detección de pares de interacción binarios con asociación directa. Como “carnada” se empleó la proteína WW12⁵³⁶⁻⁷³² subclonada en el vector pPC97 (plásmido convertido al sistema Gateway que permite la fusión del ORF de interés al dominio de unión del factor GAL4). Para la búsqueda de interacciones se analizó la activación de los genes reporteros *lacZ* e *HIS3*, presentes en el genoma de las levaduras.

En un primer rastreo a gran escala se evaluó la activación del gen *lacZ* a través de un ensayo colorimétrico de actividad de β -galactosidasa. Se observaron 4 colonias azules (datos nos mostrados), indicando que podrían corresponder a ligandos de la proteína WW12. Las colonias fueron reestriadas y se sometieron a un segundo rastreo, en el que se evaluó la capacidad de crecer en un medio carente de histidina; contrariamente al resultado del ensayo colorimétrico, ninguno de los 4 clones resultó positivo (datos nos mostrados).

Discusión

Con el objetivo de identificar nuevas interacciones entre proteínas de *T. cruzi* que pudieran ser utilizadas como potenciales blancos moleculares de drogas antiparasitarias, nos enfocamos en una proteína hipotética que posee dominios WW y es exclusiva del parásito, TcCLB.504427.180 (WW12) (Reinert 2011).

Las proteínas que contienen dominios WW sirven de plataforma para el ensamblado de redes multiproteicas a través de la unión a ligandos ricos en prolina (Kay, Williamson y col. 2000, Hu, Columbus y col. 2004, Ingham, Colwill y col. 2005, Hesselberth, Miller y col. 2006) y participan en diversos procesos metabólicos entre ellos, el proceso de diferenciación. En humanos, la proteína WWOX, parecería ser esencial en la regulación de células progenitoras durante la formación del tejido óseo y la diferenciación a osteoblastomas (Aqeilan, Hassan y col. 2008, Salah, Aqeilan y col. 2010); en la piel, la E3 ligasa ICTH, modula la diferenciación de keratinocitos epidérmicos (Blanpain, Lowry y col. 2006, Rossi, Aqeilan y col. 2006). Asimismo, en *T. brucei*, las proteínas tbZFP1, tbZFP2 y tbZFP3 se encuentran implicadas en la regulación de la morfogénesis y diferenciación del parásito; estas proteínas comparten un motivo de dedo de zinc, característico de ciertas proteínas de unión a ARN, a través del cual ejercerían su función regulatoria (Hendriks, Robinson y col. 2001, Paterou, Walrad y col. 2006). tbZFP2 y tbZFP3 contienen además, un dominio WW y se demostró que son capaces de interactuar con tbZFP1, que posee un motivo rico en prolina. Trabajos previos sugieren que esta interacción sería crucial para su función (Paterou, Walrad y col. 2006), lo cual resalta la importancia de las proteínas que contienen dominios WW en la biología de los trypanosomátidos. Consistentemente con el enriquecimiento de tbZFP1 durante la diferenciación de *T. brucei* de la forma sanguínea a la forma procíclica (Hendriks, Robinson y col. 2001), su homólogo en *T. cruzi*, tcZFP1, y también tcZFP2, presentan un patrón de expresión diferencial durante los estadios del desarrollo del parásito (Morking, Dallagiovanna y col. 2004, Caro, Bercovich y col. 2005); más aún, tcZFP1 es capaz de interactuar con tcZFP2 y dicha interacción es mediada por el dominio WW presente en tcZFP2 (Caro, Bercovich y col. 2005).

En particular, la proteína WW12 identificada previamente *in silico*, posee tres dominios WW en el extremo C-terminal y carece de dominios adicionales (Reinert 2011). Similarmente a la proteína con dominio WW, tcZFP2, se determinó que WW12 presenta un perfil de expresión estadio-específico, observando a la proteína en epimastigotes, pero no en trypomastigotes, ni amastigotes (Figura 35). Asimismo, si bien la señal correspondiente a

WW12 detectada por inmunofluorescencia indirecta no fue la ideal, se observó que la proteína se localizaría en las cercanías del núcleo (Figura 36). Estos resultados, por otra parte nos permiten concluir que los anticuerpos policlonales producidos contra la proteína WW12 presentan una buena especificidad en la detección de la proteína recombinante, siendo capaces, también de reconocer la proteína endógena, tanto por Western blot como por inmunofluorescencia indirecta. La obtención de estos anticuerpos representa una valiosa herramienta para profundizar el estudio de WW12 en trabajos futuros.

Típicamente, los dominios WW se ubican en tándem, pero se desconoce si las repeticiones son redundantes o específicas para ciertos blancos (Salah, Alian y col. 2012). Por ejemplo, para la proteína humana WWOX, la mayoría de los ligandos caracterizados se unen al dominio WW-1, pero no al WW-2; no obstante, ambos dominios son capaces de unir ligandos comunes (Hu, Columbus y col. 2004). Frente a la falta de consenso acerca de la especificidad de los dominios en tándem, la búsqueda de pares de interacción para WW12 se realizó con una secuencia que incluyó los tres dominios WW. Como punto de partida en la búsqueda se aprovechó la información disponible sobre proteínas hipotéticas que contienen motivos ricos en prolina y que fueron identificadas *in silico* en el genoma de *T. cruzi* (Reinert 2011). El criterio de selección de las proteínas incluidas en el análisis se basó en la secuencia del motivo, teniendo en cuenta que, según la especificidad por sus ligandos, dos dominios WW de la proteína WW12 fueron clasificados en el grupo I y uno, en el grupo II/III (Reinert 2011). En este sentido, las proteínas hipotéticas TcCLB.511003.180 (PY154), TcCLB.508385.60 (PY293) y TcCLB.511571.20 (PY297), con motivo PPPY, y TcCLB.507143.80 (PL251), con motivo PPPLPP, representaron buenos candidatos a interactuar con WW12. No obstante, las predicciones *in silico* no tuvieron un buen correlato en la validación experimental debido a que no fue posible confirmar estas interacciones mediante ensayos de precipitación diferencial (Figuras 37 y 38). Considerando que en ciertos casos la fosforilación en tirosina del motivo PPPY regula la afinidad de la unión de proteínas que contienen dominios WW del grupo I (Salah, Alian y col. 2012), es posible atribuir la ausencia de interacción entre WW12 y PY154, PY293 y PY297, a la falta de fosforilación en tirosina de los ligandos putativos. Asimismo, teniendo en cuenta la proteína Prp40, cuyos dos dominios WW pertenecen al grupo V, pero además reconocen ligandos con motivos de tipo I y II (Wiesner, Stier y col. 2002), es posible suponer que WW12 pudiera unir proteínas con motivos ricos en prolina que no presentaran los motivos esperados. En este sentido, si bien hubiera resultado interesante complementar la búsqueda con proteínas con otro tipo de motivo rico en prolina, en el rastreo bioinformático del genoma de *T. cruzi* no se pudo incluir

la expresión correspondiente al grupo IV y no se hallaron proteínas con motivo del tipo V (Reinert 2011). Por otra parte, a pesar de que los dominios WW se encuentran altamente conservados (Kay, Williamson y col. 2000), aún no se logró identificar *in silico* ligandos putativos con alta probabilidad de unir un dominio WW específico o incluso, un subgrupo de dominios WW (Macias, Wiesner y col. 2002).

Debido a que no fue posible validar experimentalmente las predicciones bioinformáticas se emplearon otras estrategias para la búsqueda de interactores de WW12; las mismas incluyeron el rastreo de un lisado de epimastigotes, por medio de un ensayo de precipitación diferencial seguido de la identificación de proteínas interactuantes por espectrometría de masa, y el rastreo de una biblioteca de ADNc de epimastigotes, por medio de un ensayo de doble híbrido en levaduras. A pesar de que el empleo de estos abordajes permitió abarcar un amplio espectro de posibles ligandos, ninguno resultó eficiente para detectar pares de interacción de la proteína de interés.

El ensayo de precipitación diferencial seguido de espectrometría de masa fue empleado con éxito en la identificación de pares de interacción de proteínas que contienen dominios WW en células humanas (Ingham, Colwill y col. 2005); sin embargo, para la proteína WW12 la única banda detectada, ausente en el control, fue identificada como la proteína GST (Figura 39), sugiriendo que la proteína de fusión GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³², utilizada como “carnada”, fue parcialmente escindida por proteasas provenientes del lisado de epimastigotes.

El ensayo de doble híbrido en levaduras fue utilizado previamente para la identificación de interacciones que involucran proteínas con dominios WW, como la interacción entre ZFP2 y ZFP1, en *T. cruzi* y *T. brucei* (Caro, Bercovich y col. 2005, Paterou, Walrad y col. 2006); sin embargo, no hay antecedentes acerca de la identificación de este tipo de interacciones a través del rastreo de una biblioteca de ADNc. Si bien en un primer rastreo de interactores de WW12 se observaron cuatro clones positivos para la activación del gen reportero *lacZ*, las mismas colonias resultaron negativas al someterlas a un segundo rastreo por auxotrofia. Frente a esta situación, concluimos que los clones positivos en el primer análisis representaban resultados falsos positivos, posiblemente generados por una autoactivación del gen reportero, siendo éste un problema frecuente de la metodología utilizada.

Si bien no se logró cumplir el objetivo principal de hallar pares de interacción para la proteína WW12, mediante su caracterización bioquímica aportamos nueva información acerca de la naturaleza de la proteína. Teniendo en cuenta que la proteína WW12 no se expresa en los estadios en los que *T. cruzi* parasita al huésped humano (trypomastigote y amastigote), se descarta su utilización como blanco molecular de drogas terapéuticas para el

tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Sin embargo, debido a que su expresión es exclusiva del estadio epimastigote, consideramos que la proteína WW12 constituye un potencial blanco para el desarrollo de productos insecticidas que contribuyan a la eliminación del vector invertebrado cuando el mismo se encuentra infectado por el parásito.

Capítulo III

**Búsqueda de nuevos blancos
moleculares para la terapia de la
Enfermedad de Chagas:
proteínas que contienen dominios de
unión a AMPc**

Introducción

1. Generalidades de las vías de señalización mediadas por AMPc

Desde su descubrimiento por Rall y Sutherland, en el año 1957 (Rall and Sutherland 1958, Sutherland and Rall 1958), el AMPc fue implicado como segundo mensajero en una gran variedad de procesos biológicos que incluyen la migración celular, proliferación, diferenciación, apoptosis y el modelado del citoesqueleto, entre otros (Sutherland 1972); las vías de señalización mediadas por este nucleótido se encuentran conservadas desde bacterias hasta humanos. Típicamente, el AMPc es producido a partir de ATP por una adenilato ciclasa (AC), cuya acción se encuentra regulada por proteínas G asociadas a receptores extracelulares que son inducidos por diversos estímulos externos.

En procariontes, la familia de proteínas CAP (del inglés: *Catabolite gene Activator Protein*) es la responsable de unir AMPc (Weber, Takio y col. 1982) y la estructura del dominio de unión a nucleótido cíclico (CBD) se encuentra muy bien caracterizada (McKay and Steitz 1981, McKay, Weber y col. 1982, Weber and Steitz 1987). Involucradas en la regulación transcripcional, estas proteínas contienen además, un dominio de unión al ADN, unido covalentemente al CBD, mediante el cual, luego de la unión a AMPc, ejercen su función regulatoria (Benoff, Yang y col. 2002). En mamíferos, las vías dependientes de AMPc son transducidas principalmente por dos efectores intracelulares de localización ubicua: la clásica proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y la proteína intercambiadora activada por AMPc, Epac, más recientemente descubierta; además, en determinados tejidos se expresan canales iónicos activados por AMPc (Cheng, Ji y col. 2008).

PKA, identificada a fines de la década del 60 (Dodge, Khouangsathiene y col. 2001), representó durante mucho tiempo el único efector conocido del AMPc en células de mamífero, razón por la cual se la considera tradicionalmente como el principal efector de la vía. Pertenece a una familia de enzimas capaces de catalizar la fosforilación de residuos serina/treonina presentes en diversos sustratos y su actividad depende de los niveles intracelulares del AMPc (Shabb 2001). En su estado inactivo, PKA se encuentra en forma de holoenzima tetramérica, compuesta por dos subunidades regulatorias (R) y dos catalíticas (C). Se identificaron varias subunidades R (RI α , RI β , RII α , RII β), cada una con dos dominios de unión a AMPc, y varias subunidades C (C α , C β , C γ). La unión de dos moléculas de AMPc a cada subunidad regulatoria resulta en la liberación de las subunidades catalíticas y su consecuente activación (Berman, Ten Eyck y col. 2005). Cuando el nivel de AMPc intracelular desciende, PKA retorna a su conformación inactiva, siendo la reversibilidad de la

activación un aspecto crítico en la regulación de su función (Dodge, Khouangsathiene y col. 2001).

Las isoformas Epac1 y Epac2, se identificaron en el año 1998 (de Rooij, Zwartkruis y col. 1998, Kawasaki, Springett y col. 1998). Ambas proteínas poseen un dominio catalítico, donde reside su actividad intercambiadora de guanosina, y uno y dos dominios de unión a AMPc, respectivamente, en la región N-terminal. En ausencia de AMPc, Epac adopta una conformación de autoinhibición, en la cual la región catalítica se encuentra bloqueada por la región regulatoria N-terminal; la unión al nucleótido cíclico induce cambios conformacionales que derivan en la exposición del sitio catalítico, con el consecuente reconocimiento y activación de las pequeñas proteínas G, Rap1 y Rap2 (Brock, Fan y col. 2007). La activación de las proteínas Rap por Epac ocurre a través del intercambio de una molécula de GDP por una de GTP.

Otras enzimas claves en la señalización por AMPc son las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). Estas hidrolasas catalizan la conversión de AMPc en 5'-AMP (Conti and Jin 1999) y regulan, consecuentemente, la tasa de degradación del segundo mensajero, su concentración celular y la inactivación de la vía. Asimismo, estas enzimas catalizan la conversión de GMPc a 5'-GMP (Conti and Jin 1999). Las PDEs se clasifican en tres grupos en base a diferencias en su dominio catalítico; en particular, las de tipo I se encuentran en todos los eucariotas y son las únicas enzimas capaces de hidrolizar eficientemente nucleótidos cíclicos (Beavo 1995).

2. Características de los dominios de unión a AMPc

Debido a que en eucariotas y procariotas los dominios de unión a nucleótidos cíclicos son esenciales en la regulación de numerosas vías de señalización, los mismos fueron objeto de numerosos estudios a lo largo de los años. A partir de la comparación estructural, basada en la cristalización de distintos CBDs, se demostró que en general el núcleo del dominio está formado por una pequeña región evolutivamente conservada de aproximadamente 120 residuos, que incluye hojas- β y elementos helicoidales (Berman, Ten Eyck y col. 2005). Este núcleo se encuentra caracterizado por la presencia de una estructura de 8 hojas- β plegadas (subdominio β) (Su, Dostmann y col. 1995); una región clave del subdominio β es el bolsillo de unión a fosfato (PBC) constituido por la hebra $\beta 6$, un corto giro de hélice y la cadena $\beta 7$, que ancla el AMPc (Diller, Madhusudan y col. 2001). Por medio de alineamientos múltiples de secuencias se demostró la presencia de residuos conservados en el PBC, por ejemplo,

una arginina, que une el fosfato exocíclico del AMPc y un par glicina-glutamato, que une la ribosa (Figura 40). Más aún, se demostró que la arginina coevolucionó con un conjunto de glicinas ubicadas en diferentes regiones a lo largo del dominio, siendo de particular importancia, una glicina en el lazo distal β 2- β 3 que comunica alostéricamente el sitio de unión a AMPc con sitios reguladores distales (Berman, Ten Eyck y col. 2005, Kannan, Wu y col. 2007). Resaltando la importancia del residuo conservado arginina, se demostró que su sustitución por una alanina, en las posiciones 209 y 333 de la PKA, provoca una reducción significativa de la afinidad por el AMPc (McNicholl, Das y col. 2010).

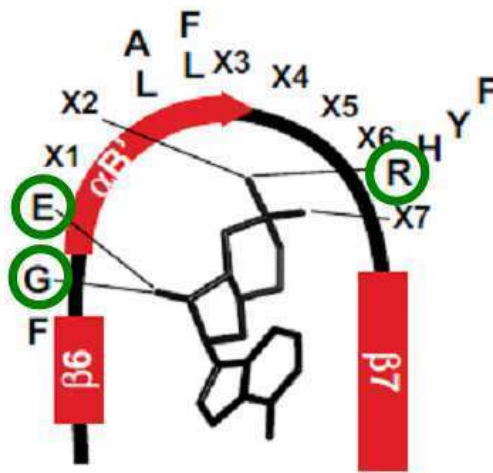


Figura 40. Representación esquemática del bolsillo de unión a fosfato presente en los dominios de unión a AMPc. Se muestra la estructura secundaria y los motivos consenso. R: arginina; G: glicina; E: glutamato. Adaptado de Kannan, N., y col. (2007).

3. Señalización mediada por AMPc en trypanosomátidos

3.1. Rol del AMPc en trypanosomátidos

A diferencia de lo que ocurre en células de mamíferos, donde el AMPc es una de las moléculas de señalización más estudiadas, poco se sabe acerca del mecanismo de acción en trypanosomátidos. En *T. brucei*, el AMPc se encuentra asociado al proceso de diferenciación: la diferenciación *in vitro* de la forma sanguínea replicativa esbelta a la forma sanguínea no replicativa redondeada fue inducida por SIF, factor soluble capaz de estimular un aumento agudo en los niveles intracelulares de AMPc. Más aún, el efecto de SIF fue simulado por análogos permeables del AMPc o etazolato, inhibidor de PDE (Vassella, Reuner y col. 1997). Similarmente, análogos del AMPc indujeron la diferenciación de

promastigotes a amastigotes en *Leishmania* (Bee, Culley y col. 2001), observación que condice con un aumento en la expresión de PKA, previo a la diferenciación (Duncan, Alvarez y col. 2001). En *T. cruzi*, los primeros estudios demostraron un rol negativo del AMPc sobre la proliferación de epimastigotes (Rangel-Aldao, Allende y col. 1987, Rangel-Aldao, Triana y col. 1988): altos niveles de AMPc bloquearon la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Santos and Oliveira 1988) y consistentemente con esta observación, conocidos mitogénos del parásito, como el suero fetal bovino, fueron capaces de disminuir los niveles del segundo mensajero (Oliveira, Rocha y col. 1993). No obstante, la inhibición genética de PKA (por expresión de PKI) o farmacológica (por el inhibidor H89) en vez de conducir a un esperado rescate, llevó también a la muerte de epimastigotes (Bao, Weiss y col. 2008). Estos resultados contradictorios indican la existencia de vías independientes de PKA y sugieren claramente la presencia en el parásito de otros efectores del AMPc biológicamente activos. En relación a esto, en busca de resistencia contra el inhibidor de PDE, CpdA, mediante un rastreo del genoma completo de *T. brucei* con una biblioteca de ARN de interferencia, Gould, M., y col. identificaron un grupo de proteínas respondedoras a AMPc (CARP1-4), exclusivas de trypanosomátidos (Gould, Bachmaier y col. 2013). Si bien la unión a AMPc no fue verificada experimentalmente, la predicción de la presencia de un CBD en CARP1 claramente sugiere un importante rol de esta proteína en las vías de señalización dependientes de AMPc (Gould, Bachmaier y col. 2013).

En *T. cruzi* el AMPc se encuentra involucrado también en el proceso de osmoregulación; se reportó un aumento en los niveles de este segundo mensajero cuando epimastigotes fueron sometidos a un estrés hiposmótico, estimulando el tráfico de una acuaporina desde acidocalcisomas al complejo vacuolar contráctil (Rohloff and Docampo 2008).

Similarmente a lo observado en *T. brucei* y *Leishmania*, existen evidencias que sugieren un posible rol del AMPc en la diferenciación de *T. cruzi*: el paso de epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos fue acompañado por un aumento en los niveles de AMPc, efecto simulado por análogos de AMPc o por la inhibición de PDE (Gonzales-Perdomo, Romero y col. 1988, Rangel-Aldao, Triana y col. 1988, Fraidenraich, Pena y col. 1993); asimismo, los niveles del ARNm de TC26, gen fuertemente asociado a la metaciclogénesis, aumentaron por el efecto de análogos de este segundo mensajero (Heath, Hieny y col. 1990). Por otra parte, estudios relacionan esta vía de señalización con la invasión celular: se reportó que la invasión de células hospedadoras por parte de parásitos débilmente infectivos estaría regulada por un aumento en los niveles de AMPc intracelular y posterior liberación de Ca^{+2} de acidocalcisomas (Neira, Ferreira y col. 2002). La invasión del parásito implica el

reclutamiento y fusión de lisosomas en el sitio de entrada (Andrews 1995); el AMPc es capaz de potenciar la exocitosis de lisosomas dependiente de la liberación de Ca^{+2} , así como también, la invasión celular del parásito mediada por lisosomas (Rodríguez, Martínez y col. 1999). En concordancia con esto, la intervención farmacológica de la vía de AMPc fue capaz de modular la invasión del parásito (Rodríguez, Martínez y col. 1999, Fernandes, Neira y col. 2006). Interesantemente, luego de la adhesión e invasión celular, el clivaje de un tetrapéptido de fibronectina, presente en la célula hospedadora, por parte de proteasas específicas del parásito provocó una aceleración en la diferenciación a amastigotes y un concomitante aumento en el nivel de AMPc intracelular (Ouassisi, Cornette y col. 1992).

3.2. Efectores del AMPc en trypanosomátidos

La reciente secuenciación de diversos genomas de trypanosomátidos reveló la existencia de diferencias sustanciales en la señalización mediada por AMPc entre estos organismos y eucariotas superiores. Algunas de estas diferencias importantes incluyen el hecho de que los genomas de trypanosomátidos no codifican para receptores acoplados a proteínas G, ni para proteínas G heterotriméricas, así como tampoco parecerían contener secuencias correspondientes a proteínas del tipo Epac, ni canales iónicos activados por AMPc (El-Sayed, Myler y col. 2005). Asimismo, la arquitectura molecular predicha de la adenilato ciclasa de trypanosomas presenta grandes diferencias estructurales respecto de su contraparte humana (Figura 41). La AC trypanosomal cuenta con un dominio C-terminal intracelular catalítico, altamente conservado entre trypanosomas; un único dominio transmembrana; y un dominio N-terminal variable, presumiblemente extracelular (Naula and Seebeck 2000). Esta estructura sugiere que las ciclasas trypanosomales podrían actuar como receptores de señales externas, similares a los receptores de guanilato ciclasa presentes en el epitelio olfativo de mamíferos (Yu, Avery y col. 1997). Interesantemente, si bien los residuos clave del dominio catalítico son similares a los de las ciclasas de mamíferos (Naula and Seebeck 2000), una evidencia que sugiere un mecanismo catalítico conservado, las ACs trypanosomales parecerían ser insensibles a agentes activadores de las ciclasas de mamíferos, como GTP, análogos de GTP, forskolina y la toxina del cólera (Rolin, Hanocq-Quertier y col. 1996), lo cual refuerza la idea de que en trypanosomas estas proteínas no serían reguladas vía proteínas G heterotriméricas (Naula and Seebeck 2000).

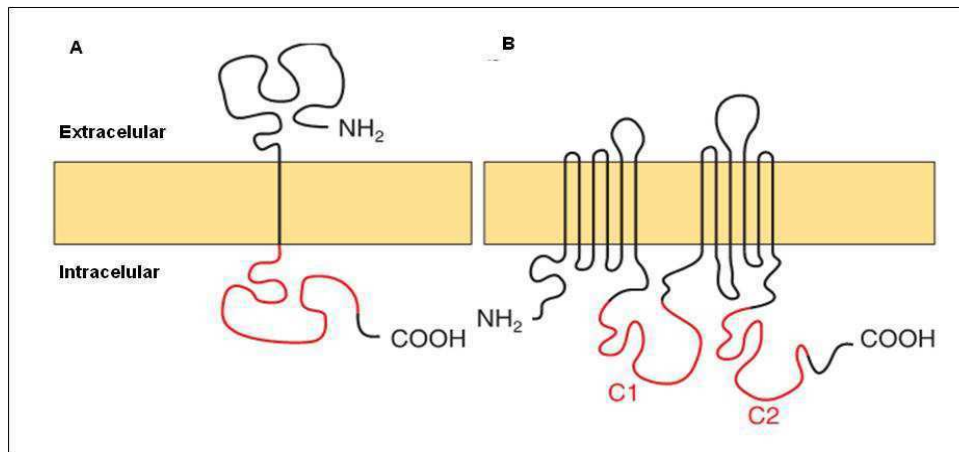


Figura 41. Predicción de la arquitectura molecular de la adenilato ciclasa de trypanosomas y mamíferos. (A) Adenilato ciclasa trypanosomal; en rojo se indica el dominio catalítico. (B) Adenilato ciclasa de mamíferos; en rojo se indican los dos subdominios (C1 y C2) que conforman el dominio catalítico. Adaptado de Naula, C. y Seebeck, T. (2000).

En el genoma de los trypanosomátidos se encontraron genes conservados para las subunidades regulatoria y catalítica de la PKA (Huang, Weiss y col. 2006). En *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, PKA es inhibida por el inhibidor específico de la PKA de mamíferos, PKI, lo cual indica que estas enzimas estarían estructural y topológicamente relacionadas (Tagoe, Kalejaiye y col. 2015). Sin embargo, en *T. brucei*, la subunidad regulatoria parecería unir GMPc y no AMPc, a pesar de que no hay evidencia contundente de que GMPc sea producido por estos parásitos (Shalaby, Liniger y col. 2001). Particularmente, en *T. cruzi* las subunidades regulatorias (TcPKAr) y catalíticas (TcPKAc) presentaron una localización en la membrana plasmática y en la región flagelar (Huang, Werner y col. 2002, Huang, Weiss y col. 2006) y al igual que en mamíferos, se sugirió que TcPKA sería una proteína tetramérica (Ulloa, Mesri y col. 1988, Ochatt, Ulloa y col. 1993). TcPKAr fue capaz de interactuar con gran afinidad con numerosas proteínas integrales de membrana, ATPasas de tipo P, hecho que sugiere que estas proteínas anclarían a PKA a la membrana plasmática, permitiendo su compartimentalización y en consecuencia, favoreciendo la especificidad por sus sustratos (Bao, Weiss y col. 2009). La importancia funcional de PKAc en *T. cruzi* se evidenció al observar un efecto letal sobre epimastigotes luego de expresar el inhibidor PKI; conjuntamente, la muerte de los parásitos por acción del inhibidor H89 demostró la esencialidad de dicha enzima para la viabilidad de *T. cruzi*, resaltando la importancia de la vía de señalización de AMPc-PKA en este organismo (Bao, Weiss y col. 2008).

El genoma de los trypanosomátidos codifica para cuatro clases de PDE de tipo I (PDE-A a PDE-D) y, al igual que en humanos, no contiene miembros de otros tipos (Beavo 1995). Si bien el dominio catalítico es altamente similar al de su contraparte en humanos (Kunz, Beavo y col. 2006), trabajos previos demostraron que ciertos inhibidores de PDE de mamíferos no presentaron actividad significativa contra las PDEs de parásitos, sugiriendo que estas enzimas serían farmacológicamente diferentes (Johner, Kunz y col. 2006, Laxman, Riechers y col. 2006). Recientemente, la relevancia de las vías de señalización mediadas por AMPc en *T. brucei* fue demostrada por la validación farmacológica de la utilización de PDE de trypanosomas como blanco de drogas (de Koning, Gould y col. 2012); la inhibición de PDE por CpdA (compuesto inhibidor de las dos isoformas de PDE-B de *T. brucei*) provocó un importante aumento en los niveles intracelulares de AMPc, frenó inmediatamente la proliferación y provocó la muerte celular en tres días.

Las diferencias presentes en la vía mediada por AMPc en trypanosomátidos respecto de su contraparte en humanos, sugieren fuertemente la existencia de un mecanismo de señalización altamente inusual; en conjunto con las numerosas evidencias que demuestran la esenciabilidad de esta vía en los parásitos, es posible considerar a la cascada de señalización del AMPc como un blanco novedoso para el desarrollo de drogas antiparasitarias.

3.3. Identificación de proteínas putativas que contienen dominios de unión a nucleótidos cíclicos en *T. cruzi*

Teniendo en cuenta la evidencia experimental que sugiere la existencia en trypanosomas de efectores biológicamente activos del AMPc distintos de PKA y con el fin de identificar proteínas con dominios de unión a nucleótidos monofosfato cíclicos (NMPc) que podrían actuar *in vivo* como nuevos efectores del AMPc en *T. cruzi*, nuestro grupo de trabajo rastreó el proteoma predicho del parásito por medio de la combinación de distintos métodos de búsqueda *in silico* (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). La lista final de las posibles proteínas que contienen CBDs se generó a partir de candidatos que surgieron al utilizar al menos dos métodos diferentes de búsqueda y se muestran en orden descendente según el valor-E, asignado por la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk>) (Figura 42). Notablemente, en la mayoría de los casos la lista contiene dos parálogos, posiblemente debido al genotipo híbrido de la cepa CL Brener, que comprende dos haplotipos divergentes, *Esmeraldo-like* (TcII) y *Non-Esmeraldo-like* (TcIII) (El-Sayed, Myler y col. 2005).

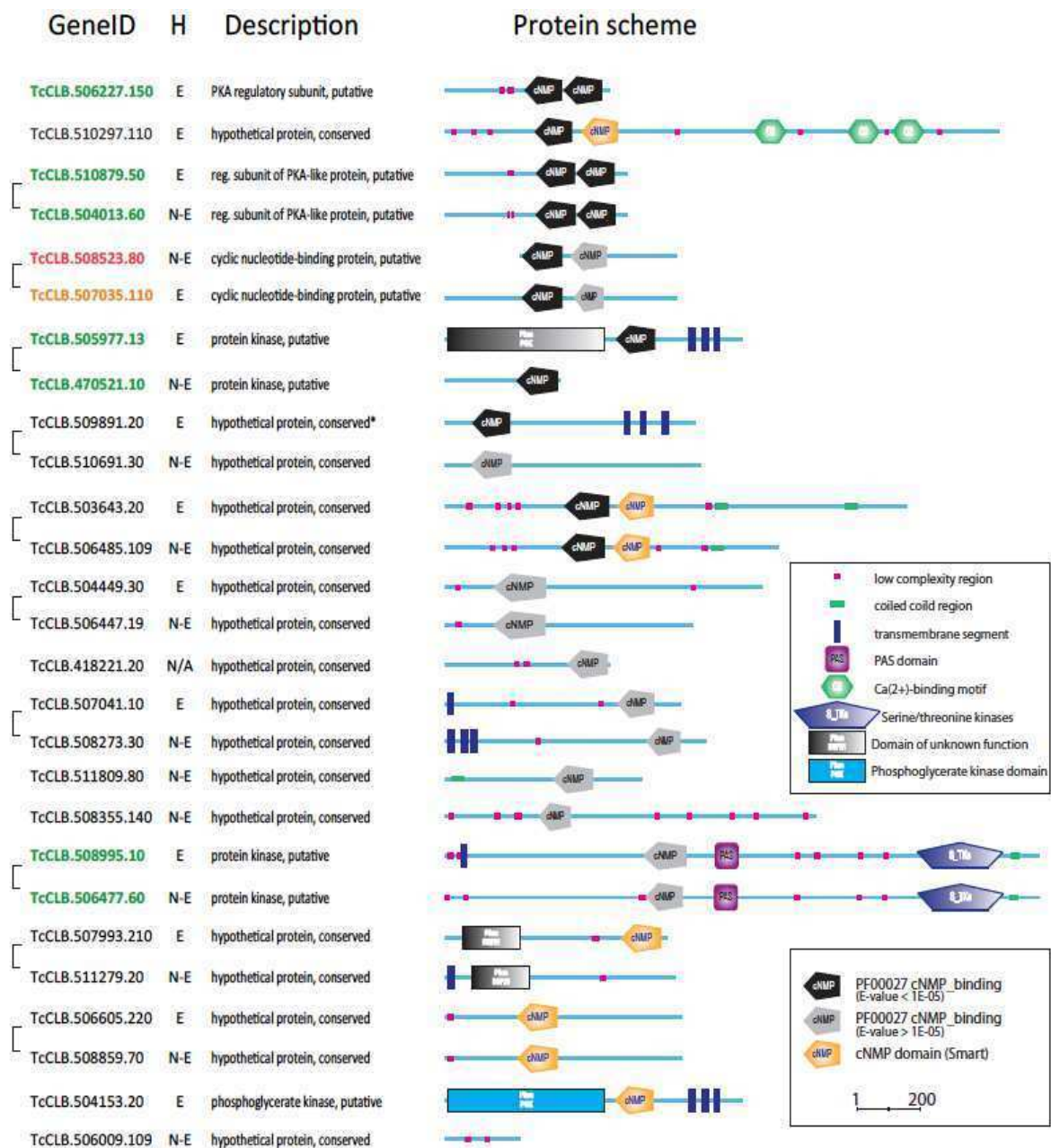


Figura 42. Identificación de proteínas putativas con dominios de unión a NMPc en *T. cruzi*. Se identificaron 27 proteínas en el genoma del parásito a través de la combinación de los métodos de búsqueda: HMMER y BLAST, para la similitud y Smart y Prosite, para los dominios. Se muestran las proteínas identificadas por al menos dos de las técnicas mencionadas y se listan en orden descendente según el valor-E obtenido por Pfam. Gris y negro: dominios detectados por la base de datos Pfam; amarillo: dominios detectados por Smart. Los corchetes de la izquierda indican pares de parálogos; H: haplotipo; E: *Esmeraldo-like*; N-E: *Non-Esmeraldo-like*; N/A: no disponible. IDs en verde: Proteínas quinasas. Adaptado de Jager, A., y col. (2014).

Interesantemente, la mayoría de las proteínas con dominios de unión a NMPc identificadas presentan ortólogos en el resto de los trypanosomátidos (Tabla 7), lo cual sugiere la presencia de vías de señalización comunes entre estos organismos.

<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Leishmania major</i>
TcCLB.506605.220	Tb11.v5.0149	LmjF.14.0050
TcCLB.506227.150	Tb11.v5.0587	LmjF.13.0160
TcCLB.510297.110	Tb11.v5.0233	LmjF.36.0830
TcCLB.509891.20	-	LmjF.34.4620
TcCLB.510879.50	-	LmjF.34.2820
TcCLB.507035.110	Tb927.11.16210	LmjF.32.3970
TcCLB.507041.10	Tb927.11.15730	LmjF.32.2530
TcCLB.503643.20	Tb927.3.5020	LmjF.29.1040
TcCLB.504153.20	Tb927.11.2380	-
TcCLB.507993.210	-	LmjF.18.0130
TcCLB.505977.13	-	LmjF.15.1200
TcCLB.504449.30	-	LmjF.15.1190
TcCLB.508995.10	Tb11.v5.0534	LmjF.20.0770
TcCLB.508859.70	Tb11.v5.0149	LmjF.14.0050
TcCLB.511809.80	Tb927.7.2320	-
TcCLB.506009.109	-	-
TcCLB.510691.30	-	LmjF.34.4620
TcCLB.504013.60	-	LmjF.34.2820
TcCLB.508523.80	Tb927.11.16210	LmjF.32.3970
TcCLB.508273.30	Tb927.11.15730	LmjF.32.2530
TcCLB.506485.109	Tb927.3.5020	LmjF.29.1040
TcCLB.508355.140	Tb927.11.2140	LmjF.27.1480
TcCLB.511279.20	-	LmjF.18.0130
TcCLB.506447.19	-	LmjF.15.1190
TcCLB.470521.10	-	LmjF.15.1200
TcCLB.506477.60	Tb11.v5.0534	LmjF.20.0770
TcCLB.418221.20	Tb927.8.2130	LmjF.23.0160

Tabla 7. Genes que contienen dominios de unión a NMPc en trypanosomátidos. Lista de genes de *T. cruzi* (cepa CL Brener) y sus ortólogos en *T. brucei* (cepa TREU927) y *L. major* (cepa Friedlin). -: ausencia de ortólogo. Adaptado de Jager, A., y col. (2014).

Mediante un análisis filogenético nuestro grupo de trabajo observó que las proteínas segregan en dos ramas principales: una rama contiene proteínas quinasas hipotéticas (Figura 43 A, recuadros verdes), y la otra, incluye proteínas hipotéticas que presentan o no dominios asociados. Por otro lado, el análisis filogenético de los CBDs presenta una distribución más homogénea (Figura 43 B), consistente con el alto nivel de conservación de

los dominios de unión a nucleótidos cíclicos a lo largo de la evolución. De manera similar a lo que ocurre en otros organismos, los efectores putativos en *T. cruzi* comparten un CBD conservado que permitiría el reconocimiento de nucleótidos cíclicos por parte de proteínas con funciones diversas (Jager, De Gaudenzi y col. 2014).

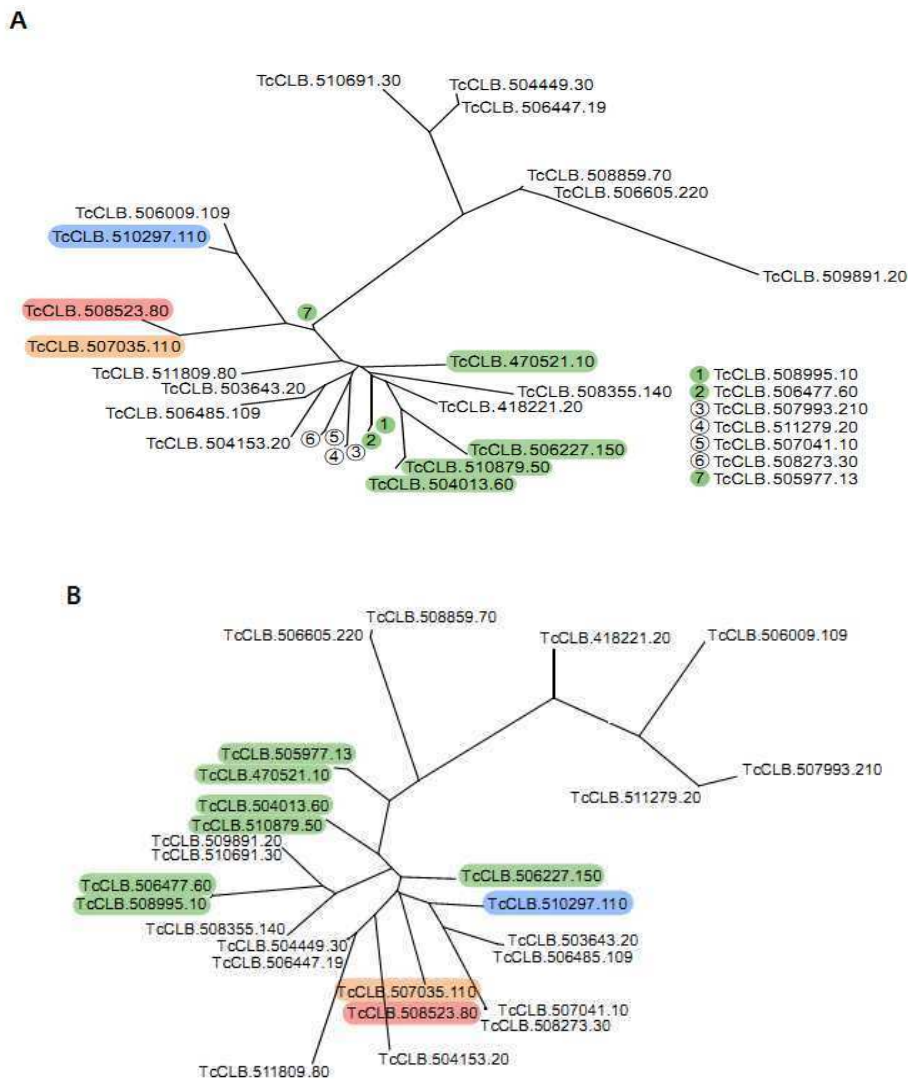


Figura 43. Análisis filogenético de las proteínas putativas que contienen dominios de unión a NMPc en *T. cruzi*. (A) Análisis de la versión completa de las proteínas. (B) Análisis de los CBDs. En verde se resaltan las proteínas quinasas. Adaptado de Jager, A., y col. (2014).

De la lista de posibles proteínas de unión a NMPc aquellas cuyos CBDs presentan los valores-E más bajos (según la base de datos Pfam), y por lo tanto, representan los

candidatos más fuertes a unir NMPc, son las siguientes: TcCLB.510297.110 (valor-E: $2,3 \times 10^{-13}$), TcCLB.508523.80 (valor-E: 8×10^{-13}) y TcCLB.507035.110 (valor-E: $1,5 \times 10^{-13}$). TcCLB.510297.110 codifica para una proteína hipotética de 1.691 aminoácidos, con un PM de 190 kDa y una alta expresión del ARN en el estadio de trypomastigote metacíclico (Minning, Weatherly y col. 2009). TcCLB.507035.110 y TcCLB.508523.80 son variantes alélicas que comparten un 70 % de identidad de secuencia, con un 100 % de identidad dentro del CBD. TcCLB.507035.110 codifica para una proteína de 708 aminoácidos y presenta altos niveles de ARNm en trypomastigotes, mientras que TcCLB.508523.80 codifica para una proteína de 218 residuos menos. TcCLB.507035.110 y TcCLB.508523.80 contienen dos CBDs dentro de la secuencia compartida (residuos: 233–345/372–489 y residuos: 5–117/144–261, respectivamente) y no se les identificó otra función o presencia de otros dominios (Figura 42). Interesantemente, el análisis de las secuencias de TcCLB.507035.110 y TcCLB.508523.80 mostró que son ortólogas del gen que codifica para la proteína respondedora a AMPc, CARP1 de *T. brucei* (Tb927.11.16210; Tabla 7).

3.4. Características de los CBDs de *T. cruzi*

Como resultado de un alineamiento múltiple de secuencias entre los candidatos más fuertes a unir NMPc de *T. cruzi* (TcCLB.510297.110 y TcCLB.508523.80) y efectores del AMPc presentes en otros organismos, nuestro grupo de trabajo demostró que las proteínas del parásito conservan las características principales de los motivos consenso presentes en los CBDs. En particular, se destacan glicinas conservadas en distintas regiones del dominio, pero más importante aún, una alta identidad dentro del PBC, donde se observó la presencia de una arginina (en la posición 91), que interactuaría con el grupo fosfato del NMPc y un par glicina-glutamato, que anclaría la ribosa (Figura 44). Concomitantemente con estas observaciones, el modelado molecular de CBDs de *T. cruzi*, utilizando como templatado a la subunidad regulatoria α de la PKA de mamíferos (PKA-R1 α), demostró claramente la formación de un bolsillo de unión a AMPc dentro del cual el nucleótido estaría estabilizado tanto por interacciones polares como no polares, similares a las halladas en estructuras cristalográficas conocidas (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). En particular, los residuos más conservados se encuentran en buena posición para interactuar con el nucleótido cíclico (Jager, De Gaudenzi y col. 2014).

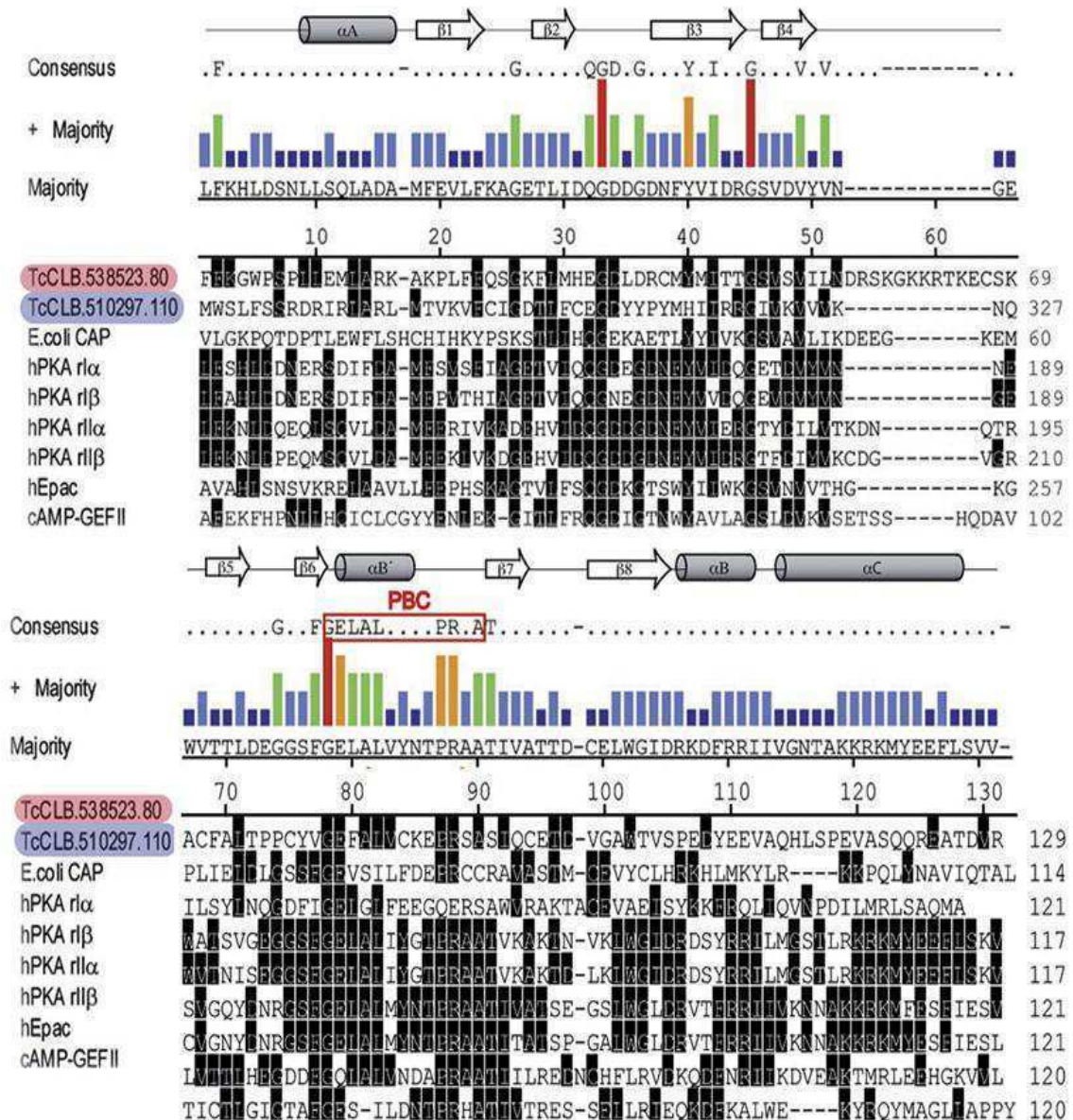


Figura 44. Alineamiento múltiple de secuencias de CBDs. Se alinearon secuencias de CBDs identificados en *T. cruzi* y otros efectores del AMPc. El recuadro rojo resalta los residuos del bolsillo de unión a fosfato. En rosa y violeta se resaltan los candidatos más fuertes a unir NMPc de *T. cruzi*. Adaptado de Jager, A., y col. (2014).

4. Hipótesis y objetivo general

Siendo que numerosas evidencias indican que la vía mediada por AMPc es esencial para el parásito, con características únicas y proteínas divergentes respecto de su contraparte humana (Naula and Seebeck 2000, Tagoe, Kalejaiye y col. 2015) y considerando que podría

estar involucrada en los mecanismos de patogenicidad de *T. cruzi* (Neira, Ferreira y col. 2002), la caracterización de efectores de esta vía de señalización ayudaría a comprender los mecanismos mediados por AMPc y proporcionaría un atractivo conjunto de nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de drogas antiparasitarias. Bajo esta premisa, nuestro objetivo principal consistió en caracterizar proteínas con dominios de unión a nucleótidos cíclicos, como potenciales efectores de las vías dependientes de AMPc en *T. cruzi*.

Resultados

1. Caracterización bioquímica de proteínas que contienen dominios de unión a AMPc en *T. cruzi*

Con el fin de identificar nuevos efectores de la vía de señalización mediada por AMPc en *T. cruzi* se llevó a cabo una búsqueda *in silico* del genoma del parásito, a partir de la cual se identificaron múltiples proteínas con potenciales dominios de unión a NMPc (Figura 42) (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). Como prueba de principio se evaluó mediante ensayos de precipitación diferencial la capacidad de la proteína TcCLB.508523.80 de unir AMPc, siendo que la misma constituye uno de los candidatos más promisorios (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). Asimismo, se analizó la capacidad de unir el nucleótido cíclico de otros dos candidatos: TcCLB.510691.30 (valor-E: $8,7 \times 10^{-8}$, según la base de datos Pfam) y TcCLB.507993.210 (valor-E: 4,98, según la base de datos SMART). Para el análisis, se expresaron como proteínas de fusión a un *tag* de histidinas (pDESTTM17) la secuencia codificante que comprende los dos CBDs de TcCLB.508523.80 (residuos: 1-271; PM: 33,2 kDa); la secuencia completa de TcCLB.510691.30, que contiene un único CBD (PM: 88,7 kDa); y la secuencia que comprende el único CBD de TcCLB.507993.210 (residuos: 513-650; PM: 18,2 kDa).

En concordancia con lo predicho *in silico*, la proteína recombinante His-TcCLB.508523.80¹⁻²⁷³ se unió a una resina de agarosa-AMPc (Figura 45 A); sin embargo, His-TcCLB.510691.30 e His-TcCLB.507993.210⁵¹³⁻⁶⁵⁰ no fueron capaces de unir AMPc *in vitro* (Figura 45 B y C, respectivamente).

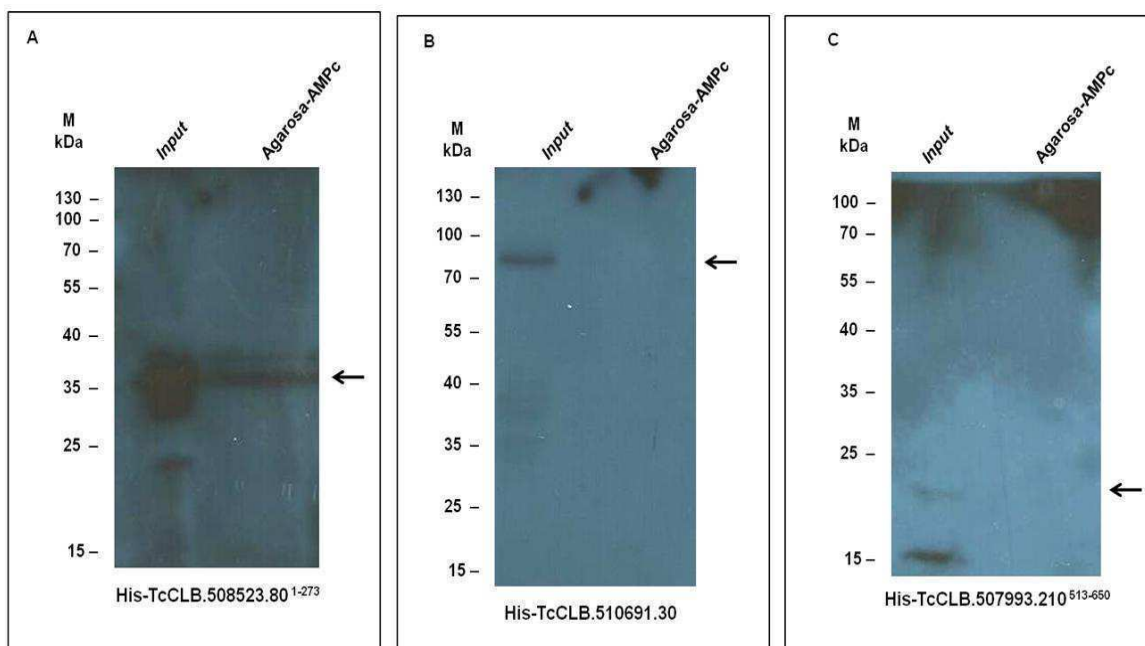


Figura 45. Ensayos de unión a AMPc. Mediante ensayos de precipitación diferencial con una resina de agarosa conjugada a AMPc se evaluó la capacidad de unir dicho nucleótido cíclico de las siguientes proteínas: **(A) His-TcCLB.508523.80¹⁻²⁷³** (secuencia que comprende los dos CBDs); **(B) His-TcCLB.510691.30** (versión completa) y **(C) His-TcCLB.507993.210⁵¹³⁻⁶⁵⁰** (secuencia que comprende el único CBD). En todos los casos, se utilizaron lisados bacterianos enriquecidos en las proteínas de interés (1-5 μ g de proteínas) y se analizó el resultado por Western blot con un anticuerpo anti *tag* de histidinas (dilución 1/2.500). Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas evaluadas en cada caso. M: marcador de PM.

Con el objeto de ampliar el estudio de las proteínas analizadas se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias, junto a secuencias de efectores del AMPc conocidos: CAP, de *E. coli* y Epac, de humanos. Como se mencionó anteriormente, la proteína TcCLB.508523.80 presenta características conservadas de los motivos presentes en los CBDs (Jager, De Gaudenzi y col. 2014): además de residuos glicinas conservados, contiene una secuencia PRSA dentro del PBC, que se asemeja a las secuencias ERSA y PRAA de CAP y Epac, respectivamente, claves para la unión a AMPc (Shabb and Corbin 1992, Holz, Chepurny y col. 2008); asimismo, conserva el par glicina-glutamato, importante para el anclaje a la ribosa (Kannan, Wu y col. 2007). Por otro lado, la presencia de residuos conservados para las proteínas TcCLB.510691.30 y TcCLB.507993.210 indica un consenso general de un CBD; no obstante, en ambos casos, no se observa un consenso dentro del bolsillo de unión a fosfato (Figura 46).

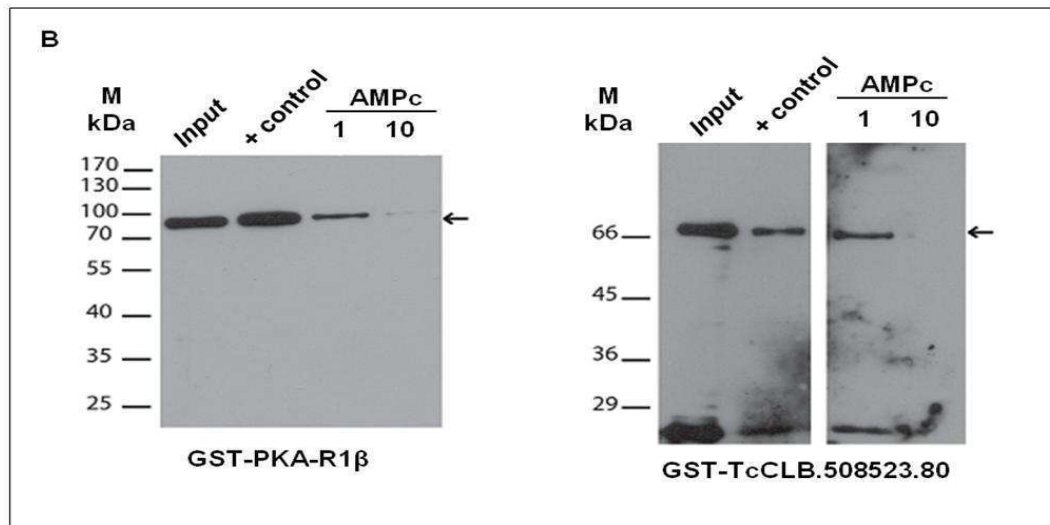
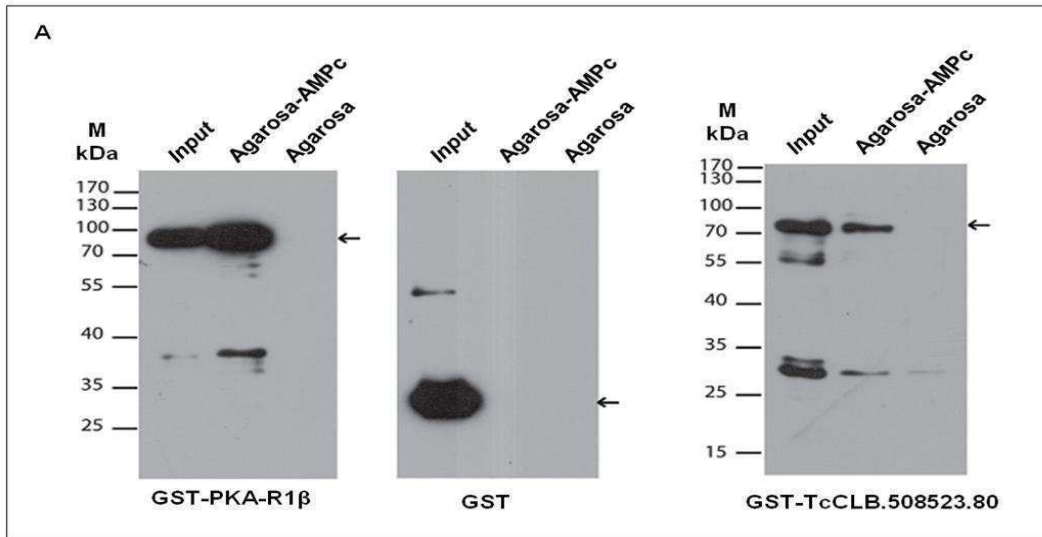


Figura 46. Análisis de secuencias de CBDs. Mediante el *software* DNASTar se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de los dos CBDs de la proteína TcCLB.508523.80, el CBD de TcCLB.510691.30, el CBD de TcCLB.507993.210 y otros dominios de unión a AMPc conocidos. Sombras negras: residuos que coinciden con el consenso. Recuadro rojo: Residuos del bolsillo de unión a fosfato (PBC).

A fin de verificar el resultado correspondiente al CBD de la proteína TcCLB.508523.80 (Figura 45 A) se realizó un ensayo de unión a AMPc con la versión completa de la proteína y se agregaron los controles pertinentes. En este caso, se trabajó con la proteína purificada, fusionada a GST (pGEX-3X; GST-TcCLB.508523.80; PM: 77,2 kDa). En paralelo, se utilizó como control positivo la subunidad regulatoria 1β de la PKA de humanos, fusionada a GST (GST-PKA-R1β, provista por el Dr. Daniel Hochbaum) y una resina de agarosa sola y la proteína GST, como controles negativos. La unión de GST-TcCLB.508523.80 a agarosa-AMPc, pero no a agarosa sola, confirma el resultado de que dicha proteína efectivamente es capaz de unir AMPc *in vitro* (Figura 47 A).

Para estudiar la especificidad de la unión se realizó un ensayo de desplazamiento de TcCLB.508523.80 de la resina de agarosa-AMPc con altas concentraciones de AMPc libre como competidor. Paralelamente, se realizó el ensayo para el control positivo. Como era esperado, el AMPc libre desplazó la unión a la resina de GST-TcCLB.508523.80 y GST-PKA-R1β, observándose el desplazamiento en un rango similar de concentraciones (Figura 47 B). Más aún, mediante ensayos de desplazamiento complementarios, se observó que mientras que la unión a agarosa-AMPc de GST-PKA-R1β fue desplazada exclusivamente por AMPc libre, la proteína GST-TcCLB.508523.80 también fue desplazada por GMPc, pero

no por AMP (Figura 47 C). Este resultado evidencia que la proteína TcCLB.508523.80 posee una afinidad dual por nucleótidos cíclicos, ya que en las condiciones ensayadas fue desplazada de la resina por AMPc y GMPc libre.



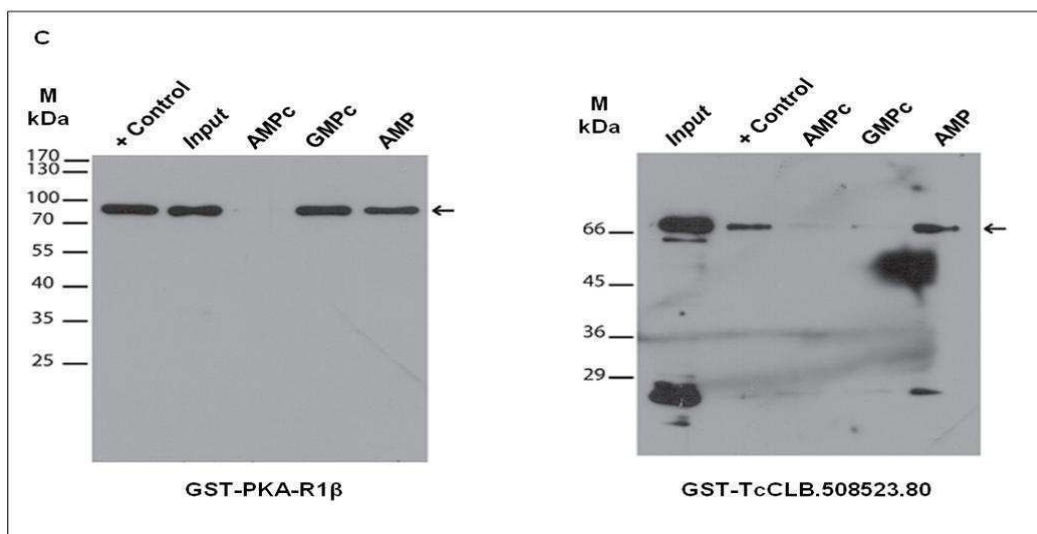


Figura 47. Evaluación de la capacidad de TcCLB.508523.80 de unir AMPc. (A) Ensayo de unión a AMPc. 500 ng de la proteína GST-TcCLB.508523.80 fueron incubados con una resina de agarosa-AMPc y se analizó su capacidad de unir el nucleótido cíclico. Se realizó el ensayo con la proteína GST-PKA-R1 β , como control positivo y una resina de agarosa sola y la proteína GST, como controles negativos. **(B) Ensayo de desplazamiento con AMPc libre.** Las proteínas GST-TcCLB.508523.80 y GST-PKA-R1 β fueron incubadas con una resina de agarosa-AMPc en presencia o ausencia de AMPc libre 1 y 10 mM. **(C) Ensayo de desplazamiento con diferentes nucleótidos libres.** Las proteínas GST-TcCLB.508523.80 y GST-PKA-R1 β fueron incubadas con una resina de agarosa-AMPc en presencia o ausencia de AMPc 10 mM, GMPc 10 mM o AMP 10 mM. + Control: proteína unida a agarosa-AMPc en ausencia del nucleótido libre. En todos los casos se analizaron los resultados por Western blot con un anticuerpo anti-GST (dilución 1/2.500). Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas analizadas. M: marcador de PM.

2. Validación funcional de TcCLB.508523.80 como efector del AMPc en *T. cruzi*

Nuestros resultados, sumados a los antecedentes publicados para la proteína CARP1, ortóloga de TcCLB.508523.80 en *T. brucei* (Gould, Bachmaier y col. 2013), constituyen una fuerte evidencia que confirmaría la hipótesis de que TcCLB.508523.80 representa un nuevo efector del AMPc en *T. cruzi*. Por esta razón, focalizamos nuestros esfuerzos en la validación funcional de la misma.

2.1. Efecto de TcCLB.508523.80 sobre la invasión celular mediada por AMPc en *T. cruzi*

A través del análisis del transcriptoma de los cuatro estadios del ciclo de vida del parásito se demostró un aumento significativo de los niveles de expresión del ARNm de TcCLB.507035.110 en trypomastigotes (Minning, Weatherly y col. 2009). En concordancia, resultados preliminares comunicados por B. Burleigh y N. El-Sayed, confirmarían la

sobreexpresión de mensajeros de TcCLB.507035.110 en trypomastigotes en comparación a los estadios epimastigote y amastigotes. Por otra parte, se reportó un aumento bidireccional del AMPc en el parásito y la célula hospedadora durante la invasión celular por *T. cruzi* (Neira, Ferreira y col. 2002, Epting, Coates y col. 2010). Si bien la expresión de ARN no necesariamente se correlaciona con la abundancia de proteínas, estas observaciones nos condujeron a plantear la hipótesis de que TcCLB.507035.110 podría estar involucrada en la señalización dependiente de AMPc durante la invasión de *T. cruzi*. Teniendo en cuenta que TcCLB.507035.110 y TcCLB.508523.80 representan variantes alélicas, con un 100 % de identidad dentro de la secuencia del CBD (Jager, De Gaudenzi y col. 2014), uno de los abordajes experimentales empleados para validar funcionalmente a TcCLB.508523.80 consistió en evaluar *in vivo* el efecto de esta proteína sobre la invasión celular mediada por AMPc en parásitos transgénicos que sobreexpresaban de manera estable TcCLB.508523.80.

Para la sobreexpresión de la proteína, se clonó la secuencia codificante completa (PM: 54,1 kDa) en un vector de expresión de *T. cruzi* (pTEX) y epimastigotes de la cepa Y, fueron transfectados con el plásmido pTEX-TcCLB.508523.80 o con el plásmido vacío, como control. Previo al ensayo de invasión se corroboró por Dot blot y Western blot la expresión de la proteína de interés (Figura 48).

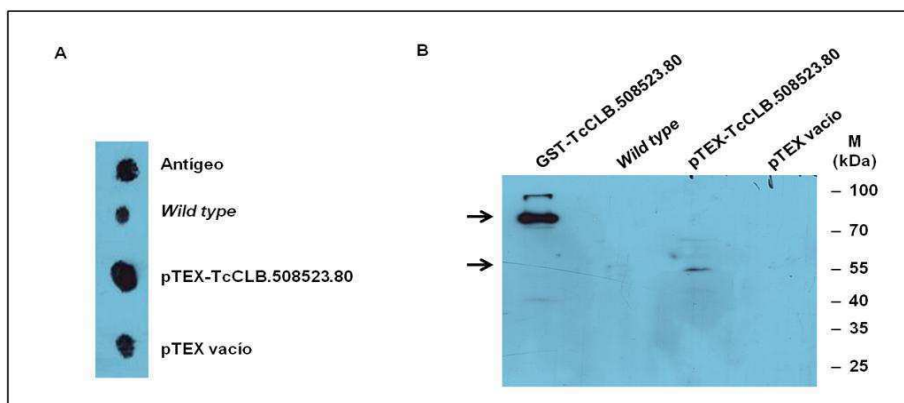


Figura 48. Expresión de la proteína TcCLB.508523.80 en epimastigotes de *T. cruzi*. 4×10^7 epimastigotes *wild type* o transgénicos (pTEX-TcCLB.508523.80 y pTEX vacío) fueron lisados y se determinó la expresión de TcCLB.508523.80 mediante ensayos de (A) Dot blot y (B) Western blot. Como control positivo del Dot blot se utilizó 800 ng de un antígeno empleado para la obtención del anticuerpo anti-TcCLB.508523.80; y del Western blot, 800 ng de la proteína recombinante GST-TcCLB.508523.80. Se revelaron las membranas con un anticuerpo anti-TcCLB.508523.80 (dilución: 1/1.000). Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas TcCLB.508523.80 y GST-TcCLB.508523.80. M: marcador de PM.

Para el ensayo de invasión celular, los epimastigotes transgénicos fueron estimulados en presencia de 8-Br-AMPc (análogo permeable del AMPc) o DMSO (solución vehículo) y luego se cocultivaron con células NRK. Los parásitos que sobreexpresaban la proteína TcCLB.508523.80 presentaron un aumento significativo en el porcentaje de infección cuando fueron incubados en presencia de 8-Br-AMPc 1 mM ($p < 0,01$) (Figura 49). Este resultado sugiere que TcCLB.508523.80 podría ejercer un rol sobre los mecanismos de invasión de *T. cruzi* mediados por vías dependientes de AMPc.

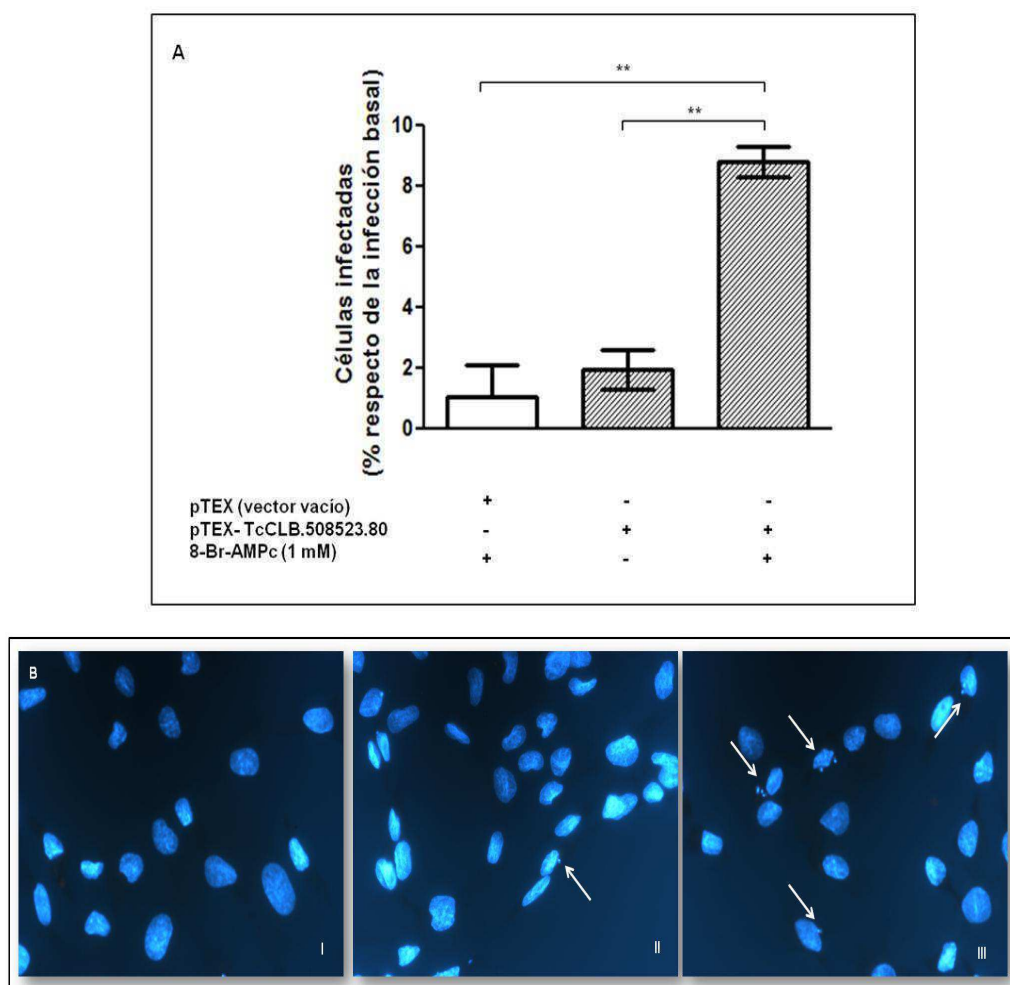


Figura 49. Efecto de TcCLB.508523.80 sobre la invasión celular mediada por AMPc en *T. cruzi*. Epimastigotes transgénicos de la cepa Y fueron estimulados durante 5 días con 8-Br-AMPc 1 mM o DMSO (control). Luego, se cocultivaron con células NRK durante 5 horas y se lavó el excedente de parásitos con PBS 1X. Transcurridas 48 horas, se fijaron los cultivos con paraformaldehído 4 % y se tiñeron los núcleos con DAPI 1 µg/ml. **(A)** Se calculó el porcentaje de infección de epimastigotes transgénicos para cada tratamiento como el número de células infectadas/100 células. Para cada tratamiento, se sustrajo el porcentaje de infección basal (pTEX vacío, DMSO). Los datos corresponden a la media de 3 experimentos independientes \pm SEM y fueron analizados mediante una prueba de Anova de una vía seguida por un *test* de Tukey de comparaciones múltiples.

** $p < 0,01$ vs. tratamiento indicado. Barras vacías: pTEX vacío; barras rayadas: pTEX-TcCLB.508523.80. **(B)** Imágenes representativas de los tratamientos: (I) pTEX vacío + DMSO; (II) pTEX-TcCLB.508523.80 + DMSO y (III) pTEX-TcCLB.508523.80 + 8-Br-AMPC 1 mM. Las flechas indican núcleos de parásitos. Aumento: 400X.

2.2. Generación de una proteína dominante negativa de TcCLB.508523.80

Existen otras estrategias para comprobar *in vivo* el efecto de TcCLB.508523.80 sobre la invasión de la célula hospedadora; una de ellas, se basa en el uso de mutantes dominante negativas que inducen la pérdida de función del alelo salvaje.

Como se mencionó previamente, el CBD de la subunidad regulatoria de la PKA posee una arginina (R) altamente conservada en el PBC (Kannan, Wu y col. 2007) y en mamíferos, el cambio de este residuo, de la posición 209 y 333 de los CBD-A y -B (respectivamente), por una lisina (K), reduce drásticamente la afinidad por el AMPc (McNicholl, Das y col. 2010). En base a este antecedente, sumado al alineamiento de secuencias y modelado molecular de los CBDs de *T. cruzi*, en donde se observó un residuo arginina en el PBC de TcCLB.508523.80 (Jager, De Gaudenzi y col. 2014), se realizó una mutagénesis sitio dirigida sobre dicho aminoácido, como primera aproximación para generar una herramienta de proteína dominante negativa de TcCLB.508523.80. Para ello, se expresó en fusión a GST la secuencia que comprende los dos CBDs de TcCLB.508523.80 con el residuo R de la posición 91 mutado por una K (GST-TcCLB.508523.80^{1-271(R91K)}) y se analizó su capacidad de unir AMPc *in vitro*. Como control positivo y negativo del ensayo se utilizó la proteína recombinante GST-TcCLB.508523.80¹⁻²⁷¹ y GST, respectivamente.

Contrariamente a lo esperado, la mutación R91K no impidió la unión de GST-TcCLB.508523.80^{1-271(R91K)} a una resina de agarosa-AMPc y por lo tanto, se descartó la posibilidad de utilizar esta mutante como dominante negativa (Figura 50). No obstante, según el modelado molecular del CBD de TcCLB.508523.80, existen otros residuos que estarían involucrados en la estabilización del nucleótido (Jager, De Gaudenzi y col. 2014) y que constituyen buenos blancos para la mutagénesis. Este trabajo se encuentra en curso.

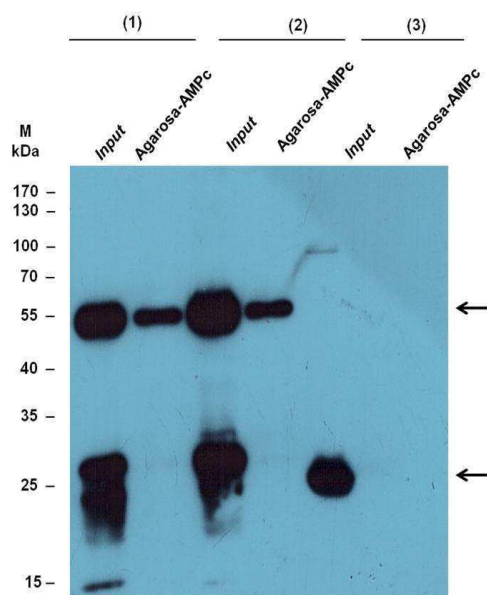


Figura 50. Ensayo de unión a AMPc para la proteína TcCLB.508523.80^{1-273(R91K)}. Por mutagénesis sitio dirigida se insertó una mutación puntual en el CBD de TcCLB.508523.80 y se analizó su capacidad de unir AMPc por precipitación diferencial con una resina de agarosa-AMPc. (1) GST-TcCLB.508523.80^{1-273(R91K)}. (2) Control positivo: GST-TcCLB.508523.80¹⁻²⁷³ *wild type*. (3) Control negativo: GST. En todos los casos se utilizaron lisados bacterianos enriquecidos en las proteínas de interés (5 µg) y se analizó el resultado por Western blot con un anticuerpo anti-GST (1/2.500). Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas, según corresponda en cada caso. M: marcador de PM.

3. Búsqueda de pares de interacción de la proteína TcCLB.508523.80 en lisados de trypomastigotes de *T. cruzi*

El descubrimiento de TcCLB.508523.80 en *T. cruzi* y CARP1 en *T. brucei* (Gould, Bachmaier y col. 2013) refuerzan las evidencias de que la señalización mediada por AMPc en trypanosomátidos es inusual y presenta características divergentes respecto de su contraparte en humanos. El armado de un mapa de interacciones de TcCLB.508523.80, con efectores río abajo del AMPc, sería de gran interés para explicar los mecanismos de acción del nucleótido en el parásito y a la vez podría constituir una fuente de potenciales blancos terapéuticos. Con tal fin, se realizó una búsqueda preliminar de posibles interactores de la proteína TcCLB.508523.80. Para el rastreo, se preconjugó la proteína TcCLB.508523.80 a una resina de agarosa-AMPc y se realizó un ensayo de precipitación diferencial con un lisado de parásitos de *T. cruzi* del estadio trypomastigote.

Como resultado del rastreo se obtuvo una banda del PM de la proteína TcCLB.508523.80 y otras bandas de distinto PM correspondientes a proteínas no identificadas (Figura 51).

Para su identificación, las bandas fueron escindidas del gel y se sometieron a clivaje por tripsina y posterior análisis por espectrometría de masa, en el Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay.

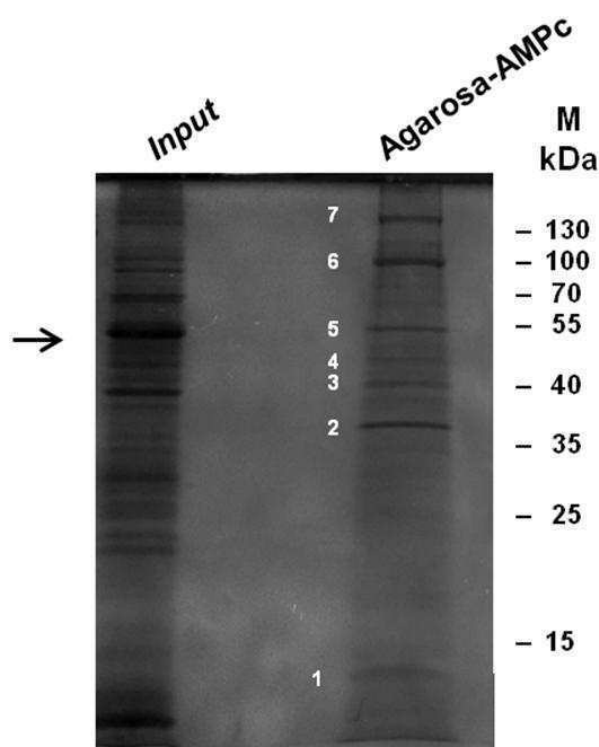


Figura 51. Búsqueda de pares de interacción para la proteína TcCLB.508523.80. Se llevó a cabo un ensayo de precipitación diferencial con 10 μg de TcCLB.508523.80 preconjugada a una resina de agarosa-AMPC y se evaluó su capacidad de precipitar proteínas de un lisado de 5×10^8 trypomastigotes. Se analizó el resultado por SDS-PAGE 12% y tinción con azul de Coomassie, en suspensión coloidal. La flecha indica la posición de la proteína TcCLB.508523.80. Las bandas 1-7 fueron escindidas del gel y se analizaron por MALDI-TOF. M: marcador de PM.

En la tabla 8 se muestran las proteínas identificadas de manera estadísticamente significativa mediante la utilización del *software* de búsqueda MASCOT.

Muestra	Proteínas identificadas	Organismo	Cobertura de la secuencia proteica (%)	Nro. Acceso (GI)
1	Nucleosido difosfato kinasa 1	<i>T. cruzi</i>	39	71667532
2	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa Actina	<i>M. mulata</i> <i>D. Marginatus</i>	8 15	306482641 315620186
3	Adenosil-homocisteinasa Adenosil-homocisteinasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa	<i>T. guttata</i> <i>A. carolinensis</i> <i>T. cruzi</i>	7 7 27	224077438 327271526 71414242
4	Reductasa dependiente de tiol-1 Proteína de unión a AMPc	<i>T. cruzi</i> <i>T. cruzi</i>	30 7	71652458 71652946
5	Proteína de unión a AMPc	<i>T. cruzi</i>	36	71652946
6	<i>Major Vault Protein</i>	<i>T. cruzi</i>	27	71406596
7	Cadena pesada de clatrina	<i>T. cruzi</i>	28	57648429

Tabla 8. Proteínas identificadas por MALDI-TOF y posterior búsqueda con el software Mascot.

En las muestras 4 y 5 se identificó una proteína de unión a AMPc de *T. cruzi*, cuya secuencia proteica cubierta en el análisis fue la siguiente (con negrita se marcan los péptidos identificados):

1	MKALKLFTNR	ICPFCQRVLI	TAKEKRVTLT	EVEVPLGDDM	PQWYKELNPR
51	ETVPMQLQVDG	KKCMIESDLI	SRYIDRISSP	ENALIGSSPY	QRHRVEFFLS
101	EIGDLVKAYF	GLVRDPFNEE	KRKSVDHNTA	YIEGIIAEHQ	GDGPYFLDDT
151	FSMAEVMVVP	FLACFRPVLS	YYCGYDIFHE	APRLKKMYVT	SMQRRTVKET
201	ISKPEEYIIG	FKSKVPKSHV	TWSLAPGYVL	FVNKYSPFSD	RPRLACALKN
251	IDLPMLEIDL	KQLPSWFRWF	NQRETVPTLL	TPRGTYVHES	QLIVHYLDDG
301	FPEHGPALLP	KDADGSYHVR	FVESNDYFM	DAMYSLIKDP	KNTNAKEEFD
351	WAAGELEKLL	AEHQFGEGPF	FGATMNAAD	VSLLPMLVHL	KACTPDLTEG
401	QDLLANYKLL	AAAAEAGLTS	EAGKKVFLSL	SEYSSYKTF	LRPSS

Esta secuencia corresponde a la proteína TcCLB.508523.80 (Tabla 8), utilizada como “carnada” en el ensayo de precipitación diferencial.

A continuación, se mencionan las proteínas identificadas en el rastreo que consideramos interesantes para profundizar su estudio en relación a su posible interacción con la proteína TcCLB.508523.80 y las vías dependientes de AMPc en *T. cruzi*:

(1) Nucleósido difosfato kinasa 1 (NDPK1) de *T. cruzi* (TcCLB.508707.200). La secuencia proteica cubierta en el análisis fue la siguiente (con negrita se marcan los péptidos identificados):

1	MTSERTFIAV	KPDGVQRCLV	GEIIQRFEKK	GYKLVALKML	QPSAEQAQQH
51	YIDLASKPFY	KDLVAYFSSG	PIVGMVWEGK	GVVKGGRVLL	GATNPADSLP
101	GTIRGDFAVD	VGRNVCHGSD	SVDSAKREIA	FWFKPEELVN	WTSHSVKQVY
151	ESA				

(2) 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa de *T. cruzi* (TcCLB.506831.40/TcCLB.509167.20). La secuencia proteica cubierta en el análisis fue la siguiente (con negrita se marcan los péptidos identificados):

1	MFRRAILLGC	SAAKTPWSEC	SNAQLVDAVK	SRKISFYGLE	QALEPDYRRA
51	IEVRREVVSE	IASQQPEAKK	KQSALHTIPF	ENYDWNKVVG	QNCENIIGYV
101	PIPLGVAGPI	LIDGKEYPIP	MATTEGALVA	STHRGARAIT	RSGGCKTLLL
151	GEGMTRAPVV	ELPSLEEAGR	LHKYCENFL	SLKEAFESTT	QYGKLNLSLK
201	VLGRKAYLR	FRATTGDAMG	MNMITKGVDK	ALSVLQQHFP	SMEILALSGN
251	YCTDKKPSAV	NWIDGRGKSV	VAEATLLADV	VEDTLKCTVD	SLVSLNIDKN
301	LVGSALAGSV	GGFNAQAANA	VAAIFIATGQ	DPAQVVESSM	CITTMSKVGK
351	DLLISVTMPS	IEVGVVGGGT	GLAAQRGCLE	LIGCGGPSKE	SPGTNAQLLS
401	RVVAAGVLSA	ELSLMSGLAA	GHLLSAHMRL	NRKKK	

(3) *Major Vault Protein* (MVP) de *T. cruzi* (TcCLB.510353.10). La secuencia proteica cubierta en el análisis fue la siguiente (con negrita se marcan los péptidos identificados):

1	MGDIIRIKRH	HYVHILDNNT	NVTRCMVGPL	VYTRKENERC	LFNPKPCIVV
51	PPRFYCIVQN	PCVRDASGNP	VIGENSSVML	RMGEEEEICFE	QEPFPLQPGE
101	VLKREEEEWL	FKLKLIPVNT	GYHVRCLCDF	TDKNSVLRRA	GTEWLVEGPQ
151	TYVPRVEVEV	LREVHAHIS	PNTALHIRAL	VKFTDRTGVP	REAGDLWTVR
201	TVGAYLPAVE	EDVIGTFQGI	TLTDTEAVHL	EALSNFTDVY	GKRRRAGERW
251	LVTKEDASIH	IPDVHEKVSG	KVRAIVLNEK	EYCVVQNPLG	ADGLNEFGRK
301	EVRKGEGRFF	LHPQEELLGG	MQPINVSKD	QALLLQAVDF	FDDNGKIRRP
351	GEKWMLHGPA	EYIPDVNVRI	LEQRNLIALD	KNEGIYVMNT	TTGVVRVIG
401	KPYMLNENEV	LWEKDLSPKV	EELLAFANGC	MSEGERNPSF	KSTRVRHRVV
451	RFNVQHNAAV	QIYDYKQKKL	RVVLGPNLVI	LSPDEEFTVV	SLSGGKPKVP
501	NLLHCLQLFL	GPRFSSDRIV	VETSDHARLE	LDLSYNWYFD	VNREEPDAKI
551	FSVPDFIGDC	CKTIASRIRG	AVAAEDFDSF	HRNSAKIIRV	AVFGRGENGE

601	INTSLRFSAN	NLVVTNIDIQ	SVEPTDAKTR	DSLQKSVQLA	IEITTKSQEA
651	AARHGKERKD	QEARGLERQ	KLLDKIEVER	TKTKWLQLQA	QSEAVQASGQ
701	SVAEAKAKAE	SLLIEVDSEL	KQAEMRAKAY	RITAESELKK	QKQKLELELE
751	FTKRQNELDI	MKARQIAETE	AERVQRMVNA	IGRETIVAVA	QAGPEMQAKL
801	LGGLGLKGYL	ITDGKSPVNL	FNTAQGLIDA	GSSAQEHS	

Discusión

La vía de señalización del AMPc en *T. cruzi* es esencial para el parásito y presenta características divergentes respecto del humano (Naula and Seebeck 2000, El-Sayed, Myler y col. 2005, Bao, Weiss y col. 2008, de Koning, Gould y col. 2012). Teniendo en cuenta que evidencias previas sugieren la existencia de una vía independiente de PKA en trypanosomátidos (Bao, Weiss y col. 2008, Gould, Bachmaier y col. 2013, Jager, De Gaudenzi y col. 2014) nos propusimos caracterizar nuevos efectores de las vías de señalización dependientes de AMPc en *T. cruzi*, a fin de utilizarlos como blancos moleculares para el desarrollo de drogas antiparasitarias.

Mediante un análisis *in silico* del proteoma de *T. cruzi* nuestro grupo de trabajo identificó diversas proteínas con dominios putativos de unión a nucleótidos cíclicos (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). En base a esos resultados se evaluó por precipitación diferencial la capacidad de unir AMPc de tres de esas proteínas: TcCLB.508523.80, TcCLB.510691.30 y TcCLB.507993.210. TcCLB.508523.80 representa uno de los candidatos más fuertes a unir AMPc, según su valor-E (base de datos Pfam: 8×10^{-13}), ya que posee una fuerte identidad con CBDs modelo (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). La presencia de residuos conservados fundamentales para el anclaje del AMPc en el bolsillo de unión a fosfato (Jager, De Gaudenzi y col. 2014) y el hecho de ser ortóloga del gen que codifica para la proteína CARP1 de *T. brucei*, recientemente propuesta como proteína sensora de AMPc en ese parásito (Gould, Bachmaier y col. 2013), refuerzan la hipótesis de que dicha proteína sería un efector del AMPc en *T. cruzi*. En concordancia con esto, la secuencia que comprende los CBDs de TcCLB.508523.80 fue capaz de unirse a una resina de agarosa conjugada a AMPc (Figura 45 A). Más aún, mediante estudios complementarios se demostró por primera vez que la versión completa de TcCLB.508523.80 fue capaz de unir AMPc *in vitro* (Figura 47 A), proporcionando una validación bioquímica a la observación previa de que su ortólogo en *T. brucei* podría ejercer un rol como sensor de AMPc en el parásito.

Contrariamente a lo predicho *in silico*, las proteínas TcCLB.510691.30 y TcCLB.507993.210 no fueron capaces de unir AMPc (Figura 45 B y C, respectivamente). Si bien la presencia de residuos conservados en ambas proteínas indicaría un consenso suficiente para la identificación de CBDs *in silico*, la falta de consenso dentro del PBC (Figura 46), explicaría el hecho de que no hayan logrado unir AMPc *in vitro*. Sin embargo, no es posible descartar que la metodología utilizada resultó inapropiada para detectar la unión de estas proteínas a AMPc. Curiosamente, a través del empleo de la misma técnica, Dremier, S.

y col. no lograron detectar la ya caracterizada unión de Epac a AMPc (Dremier, Kopperud y col. 2003), atribuyendo este resultado al hecho de que la precipitación diferencial no resultaría un ensayo adecuado para la detección de una interacción altamente dinámica como la que ocurre entre Epac y AMPc (Yu, Fan y col. 2006). Consideramos importante, por lo tanto, complementar el análisis a través de otro tipo de ensayos de unión a fin de corroborar si estas proteínas son capaces de unir el nucleótido. En este sentido, la utilización de [³H]AMPc presentó resultados satisfactorios para la detección de proteínas de unión a AMPc en ensayos de cromatografía de afinidad y filtración molecular (Dremier, Kopperud y col. 2003).

Por medio de ensayos de desplazamiento se demostró que el AMPc fue capaz de desplazar la unión entre TcCLB.508523.80 y una resina de agarosa-AMPc (Figura 47 B). En ensayos similares, en los que se utilizó agarosa conjugada a AMPc y GMPc, se observó que PKA no fue eluída de la resina con concentraciones fisiológicas de AMPc, lo cual sugiere que esta proteína poseería una afinidad mayor por los NMPc conjugados a la resina que por el AMPc libre (Scholten, Poh y col. 2006). Considerando este antecedente y el hecho de que TcCLB.508523.80 fue desplazada de la resina en un rango de concentraciones similar a la PKA, es posible suponer que una afinidad superior por el nucleótido conjugado a la resina que por el nucleótido libre, podría enmascarar la afinidad fisiológica por AMPc.

A diferencia de lo observado para PKA, la proteína TcCLB.508523.80 mostró una afinidad dual por NMPc, ya que la incubación con GMPc libre también logró desplazar la interacción de la proteína con la resina de agarosa-AMPc (Figura 47 C). En concordancia con este resultado, la colocación de GMPc en el CBD de TcCLB.508523.80 a través del modelado molecular, demostró que el hidroxilo en serina 92 podría establecer un enlace de hidrógeno con el grupo 2-amino de GMPc (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). Similarmente, la afinidad por GMPc se incrementó en gran medida por una sola sustitución serina/treonina en lugar de la alanina, de las posiciones 210 o 334, del motivo PRAAT presente en cada sitio de unión a AMPc de la subunidad regulatoria de la PKA (Shabb, Buzzeo y col. 1991); interesantemente, la serina en posición 92 de TcCLB.508523.80 reemplaza a la alanina 210 de la subunidad regulatoria I α de la PKA (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). Más aún, la secuencia PRSA del PBC de TcCLB.508523.80 se asemeja al motivo ERSA del PBC de la proteína CAP de *E. coli* (Shabb and Corbin 1992), proteína que une igualmente AMPc y GMPc, siendo exclusivamente el AMPc capaz de estimular una respuesta biológica (Ebright, Le Grice y col. 1985) a través de una transición alostérica en la estructura de CAP (Popovych, Tzeng y col. 2009).

El análisis del transcriptoma de los cuatro estadios del ciclo de vida del parásito demostró mediante *microarrays* un aumento significativo de los niveles de expresión del ARNm de TcCLB.507035.110 en trypomastigotes (Minning, Weatherly y col. 2009). Más aún, resultados preliminares de ARNseq confirmarían que transcritos de TcCLB.507035.110 se encuentran más elevados en trypomastigotes que en amastigotes a 24 horas postinfección; asimismo, la expresión sería mayor en trypomastigotes en comparación a epimastigotes (comunicación personal por Burleigh, B. y El-Sayed, N.). Si bien la expresión de ARN no necesariamente se correlaciona con la abundancia de proteínas, en base a estas observaciones y teniendo en cuenta el rol que ejerce el AMPc durante la invasión de la célula hospedadora por parte de *T. cruzi* (Neira, Ferreira y col. 2002, Epting, Coates y col. 2010), planteamos la hipótesis de que la proteína TcCLB.507035.110 podría estar involucrada en la señalización durante la invasión celular del parásito. En este contexto, siendo que TcCLB.507035.110 y TcCLB.508523.80 representan variantes alélicas, que comparten un 70% de identidad de secuencia, con un 100% de identidad dentro del CBD (Jager, De Gaudenzi y col. 2014), uno de los abordajes experimentales para validar funcionalmente a la proteína TcCLB.508523.80 como efector del AMPc en *T. cruzi*, consistió en analizar *in vivo* su efecto sobre la invasión celular mediada por AMPc. En concordancia con nuestra hipótesis, el aumento en el porcentaje de células infectadas en presencia de AMPc por parte de parásitos que sobreexpresaban la proteína TcCLB.508523.80 (Figura 49), constituyó un fuerte indicio de que esta proteína estaría involucrada en el mecanismo de invasión celular mediado por vías dependientes del AMPc.

En un intento por generar una proteína dominante negativa de TcCLB.508523.80, que pudiera servir como herramienta para comprobar el efecto de la proteína sobre la invasión celular de *T. cruzi*, se introdujo una mutación puntual en el residuo arginina 91 del PBC de TcCLB.508523.80. A diferencia de lo reportado para la subunidad regulatoria de la PKA de mamíferos, en donde la sustitución del residuo conservado arginina por una lisina, en cada CBD, redujo considerablemente la afinidad de la proteína por el AMPc (McNicholl, Das y col. 2010), la mutación puntual de TcCLB.508523.80 no logró impedir la unión de la proteína al nucleótido (Figura 50). Si bien la arginina se encuentra bien posicionada para interactuar con el AMPc (Jager, De Gaudenzi y col. 2014), este resultado sugiere que no sería esencial para que se establezca la unión y por lo tanto, es posible suponer que la ausencia de este residuo estuviera siendo compensada por otros aminoácidos. En particular, el par conservado glicina-glutamato, responsable de unir a la ribosa en otras proteínas que poseen CBDs (Kannan, Wu y col. 2007), podría ejercer dicho efecto compensatorio en TcCLB.508523.80.

Asimismo, los residuos glicina conservados en distintas regiones del dominio (Jager, De Gaudenzi y col. 2014) también podrían estar involucrados en la unión al nucleótido cíclico. Interesantemente, la mutagénesis de al menos un residuo glicina conservado en PKA impidió la unión a AMPc (Kuno, Shuntoh y col. 1988, Woodford, Correll y col. 1989); asimismo, tal como fue descrito para la glicina 178 de la PKA de ratón, si bien su rol no se evidencia en la estructura cristalográfica, la elevada conservación de este residuo sugiere un papel importante tanto en la estructura como en la función del dominio (Kannan, Wu y col. 2007). Por otra parte, según lo observado por el modelado molecular de TcCLB.508523.80, el CBD de la proteína presenta una inserción entre los aminoácidos 57 y 67, la cual genera un *loop* más elongado entre las hojas- β 4 y 5 en relación a PKA-R1 α (Jager, De Gaudenzi y col. 2014). Esta característica particular de TcCLB.508523.80 podría implicar la presencia de residuos involucrados en el anclaje del AMPc, pero que aún no fueron identificados debido a que están ausentes en otros organismos.

Considerando que la identificación de interacciones entre TcCLB.508523.80 y proteínas río abajo de la vía no solo contribuiría a la comprensión de los mecanismos de acción del AMPc en *T. cruzi*, sino que además podría constituir una fuente de potenciales blancos terapéuticos, se llevó a cabo una búsqueda preliminar de interactores por medio de un ensayo de precipitación diferencial con un lisado de trypomastigotes de *T. cruzi*. Como resultado, una de las proteínas identificadas en el rastreo fue la nucleósido difosfato kinasa 1 (NDPK1), proteína que pertenece a la familia de fosfotransferasas, estrechamente asociadas al mantenimiento energético intracelular (Pereira, Bouvier y col. 2011). En particular, las NDPKs catalizan la transferencia de un fosfato de elevada energía desde un nucleósido trifosfato dador a un nucleósido difosfato aceptor, en una reacción reversible, y poseen un amplio espectro de sustratos entre ellos, ATP y GTP (Lascau and Gonin 2000). Interesantemente, se reportó que estas enzimas son capaces de transferir un fosfato a proteínas con residuos serina o treonina, y se postuló que podrían participar en la activación de proteínas G, sugiriendo que las NDPKs también estarían involucradas en mecanismos de transducción de señales (Pereira, Bouvier y col. 2011). En concomitancia con el aumento significativo en los niveles de expresión del ARNm de TcCLB.507035.110, variante alélica de TcCLB.508523.80, en trypomastigotes (Minning, Weatherly y col. 2009), NDPK1 se expresa en los estadios trypomastigote y amastigote (Miranda, Canepa y col. 2008), apoyando el resultado de que ambas proteínas podrían interactuar en el parásito. No obstante, similarmente a lo observado en nuestro ensayo, la proteína NDPK fue precipitada de un lisado de células HEK 293 con una resina conjugada a AMPc (Scholten, Poh y col. 2006);

más aún estudios realizados en plantas de tabaco demostraron que NDPK1 fue capaz de unir AMPc *in vitro* (Laukens, Roef y col. 2001). Si bien no se identificaron dominios de unión a NMPc en la estructura de la proteína (Gomez Barroso, Pereira y col. 2010), estos antecedentes podrían sugerir que NDPK1 posee dominios de unión a AMPc no canónicos y que en el rastreo de interactores de TcCLB.508523.80 haya sido precipitada a través de una interacción con el AMPc conjugado a la resina y no a través de TcCLB.508523.80.

Otras proteínas identificadas en el rastreo fueron la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa y la *Major Vault Protein* (MVP). La primera, es una enzima que cataliza la conversión de HMG-CoA a ácido mevalónico, paso limitante en la biosíntesis de isoprenoides (Pena-Diaz, Montalvetti y col. 1997). A diferencia de mamíferos, cuyas membranas contienen principalmente colesterol, el ergosterol es el esteroide predominante en trypanosomátidos y resulta esencial para la viabilidad y función de sus membranas (Goad, Holz y col. 1984, Pena-Diaz, Montalvetti y col. 1997); resaltando la importancia de esta molécula, se demostró que inhibidores de la biosíntesis de ergosterol interfieren severamente con el crecimiento de *T. cruzi* (Urbina, Lazard y col. 1991). Si bien es poco lo que se conoce acerca de la naturaleza y regulación de la HMG-CoA reductasa en trypanosomátidos, estudios en *T. cruzi* demostraron que a diferencia del resto de los eucariotas esta enzima carece de dominio de membrana y que su actividad se encuentra mayoritariamente asociada a glicosomas (Pena-Diaz, Montalvetti y col. 1997, Concepcion, Gonzalez-Pacanowska y col. 1998).

MVP constituye el componente mayoritario de una partícula ribonucleoproteica de gran tamaño (Tanaka and Tsukihara 2012). Esta partícula fue identificada como contaminante en preparaciones de vesículas cubiertas por clatrina (Kedersha and Rome 1986), curiosamente, otra de las proteínas identificadas en nuestro análisis por MALDI-TOF. Si bien es poco lo que se conoce acerca de su función biológica, trabajos de investigación relacionaron estas partículas con la vía de señalización mediada por Akt (Yu, Fotouhi-Ardakani y col. 2002) y se postuló que MVP podría ejercer un rol de proteína de andamiaje durante la señalización inducida por el factor de crecimiento epidérmico (Kolli, Zito y col. 2004).

En base al potencial que presentan estas proteínas como blancos terapéuticos en *T. cruzi*, consideramos interesante ahondar en el estudio de su posible interacción con TcCLB.508523.80 y, consecuentemente, con la vía de señalización mediada por AMPc.

Las evidencias experimentales presentadas corroboraron experimentalmente que la proteína TcCLB.508523.80, ortóloga del gen de la proteína respondedora a AMPc, CARP1

de *T. brucei*, presenta la capacidad de unir AMPc *in vitro*. Asimismo, mediante ensayos de desplazamiento con nucleótidos libres se demostró que TcCLB.508523.80 también une GMPc, constituyendo junto con las fosfodiesterasas, una proteína con afinidad dual por nucleótidos cíclicos. Más aún, el efecto reportado de esta proteína sobre la invasión celular mediada por AMPc sugirió que TcCLB.508523.80 podría actuar como un efector del AMPc durante la invasión de la célula hospedadora. Estos resultados refuerzan la hipótesis de la existencia de efectores del AMPc exclusivos de trypanosomátidos y distintos de PKA, y hacen de la señalización mediada por AMPc una potencial fuente de blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos tratamientos antiparasitarios.

Materiales y métodos

Materiales

1. Cepas

1.1. *Escherichia coli*

- **BL21 (DE3):** F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)
- **DB3.1:** F^- gyrA462 endA1 glnV44 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B⁻) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 Δ leu mtl1. Cepa adecuada para la propagación de plásmidos que contienen el gen ccdB del sistema Gateway[®].
- **DH5 α :** F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ^- .
- **Mach1-T1:** F^- Φ (lacZ) Δ M15 Δ lacX74 hsdR(r_K⁻ m_K⁺) Δ recA1398 endA1 tonA.
- **Top 10:** F^- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ^- .

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

- **MaV203:** MAT α , leu2-3,112, trp1-901, his3 Δ 200, ade2-101, gal4 Δ , gal80 Δ , SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3_{UAS} GAL1::HIS3@LYS2, can1^R, cyh2^R.

1.3. *Trypanosoma cruzi*

- **CL Brener:** cepa originada a partir de un clon de la cepa CL de *T. cruzi*. Presenta estabilidad genética en condiciones de crecimiento de laboratorio y está incluida en la UDT TcVI (Zingales, Andrade y col. 2009).
- **Y:** cepa originaria de Brasil incluida en la UDT TcII (Zingales, Andrade y col. 2009). Se caracteriza por presentar una elevada patogenicidad y baja parasitemia (Martinez-Diaz, Escario y col. 2001).

2. Líneas celulares

- **HEK 293T**: línea altamente transfectable derivada de la línea celular HEK (células humanas embrionarias de riñón) en la que se insertó el gen sensible a la temperatura para el antígeno T de SV40.
- **NRK**: línea derivada de células normales de riñón de rata.

3. Anticuerpos

- **Anti tag de histidinas**: anticuerpo comercial monoclonal desarrollado en ratón (GenScript).
- **Anti-GST**: anticuerpo comercial monoclonal desarrollado en ratón (GenScript).
- **Anti-WW12**: anticuerpo policlonal desarrollado en ratón. Se generó en nuestro laboratorio dentro del marco del presente trabajo de investigación.
- **Anti-TcCLB.508523.80**: anticuerpo policlonal desarrollado en conejo (GenScript).
- **Anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa**: anticuerpo comercial desarrollado en oveja (GE healthcare).
- **Anti-IgG (H+L) de conejo conjugado a peroxidasa**: anticuerpo comercial desarrollado en cabra (Jackson ImmunoResearch).
- **Anti-IgG de ratón, conjugado a Alexa Fluor®555**: anticuerpo comercial desarrollado en cabra (Invitrogen).

4. Plásmidos

- **pCR™8/GW/TOPO®TA**: plásmido de entrada del sistema Gateway® (Invitrogen). Presenta una timidina (T) no apareada en los dos extremos 3'-terminal que posibilita el clonado del ORF de interés (Figura 52 A).
- **pENTR™/D-TOPO®**: plásmido de entrada del sistema Gateway® (Invitrogen). Presenta una secuencia GTGG para el clonado direccional del ORF de interés (Figura 52 B).

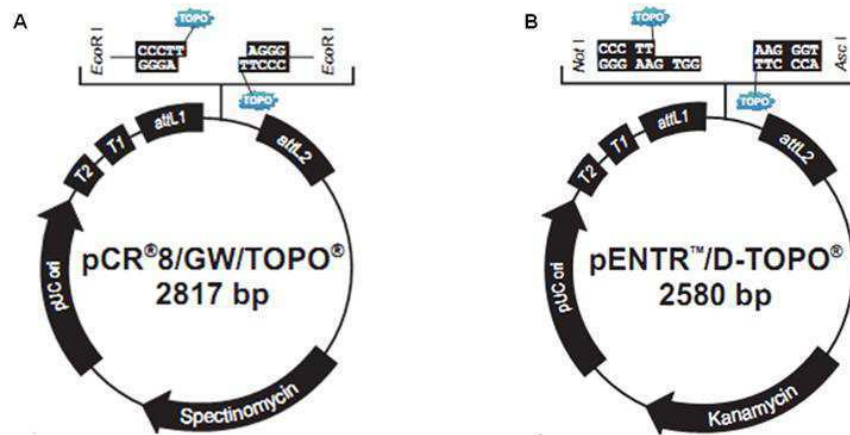


Figura 52. Mapa de plásmidos de entrada del sistema Gateway®. (A) pCRTM8/GW/TOPO[®]TA. (B) pENTRTM/D-TOPO[®]. Ambos plásmidos contienen a la topoisomerasa I unida covalentemente; *attL1* y *attL2*: sitios para la recombinación LR.

- **pGEM-T® Easy (Promega):** presenta una timidina (T) no apareada en los dos extremos 3'-terminal que posibilita el clonado del ORF de interés (Figura 53).

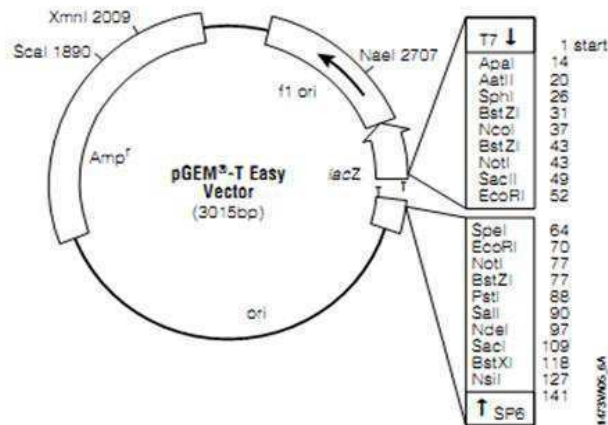


Figura 53. Mapa del plásmido pGEM-T® Easy.

- **pDESTTM15:** plásmido destino del sistema Gateway® (Invitrogen). Se utiliza para fusionar un ORF de interés con la proteína GST en el extremo N-terminal (Figura 54 A).

- **pDESTTM17:** plásmido destino del sistema Gateway® (Invitrogen). Se utiliza para fusionar un ORF de interés con un *tag* de 6 histidinas en el extremo N-terminal (Figura 54 B).

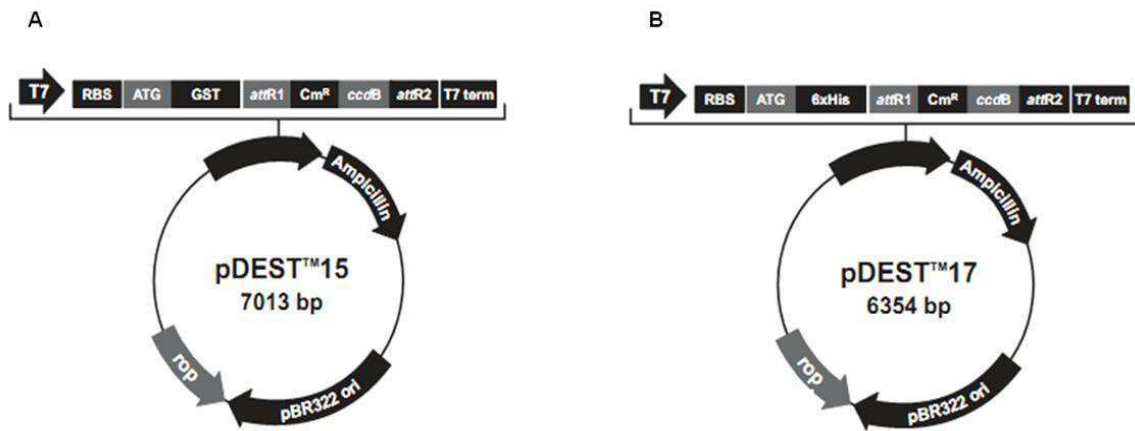


Figura 54. Mapas de plásmidos destino del sistema Gateway®. (A) pDESTTM15 y (B) pDESTTM17. En ambos plásmidos la expresión del gen de interés se encuentra regulada por un promotor para la T7 ARN polimerasa. *attR1* y *attR2*: sitios para la recombinación LR.

- **pGEX-3X (Amersham Bioscience):** plásmido que se utiliza para fusionar un ORF de interés con la proteína GST en el extremo N-terminal (Figura 55).

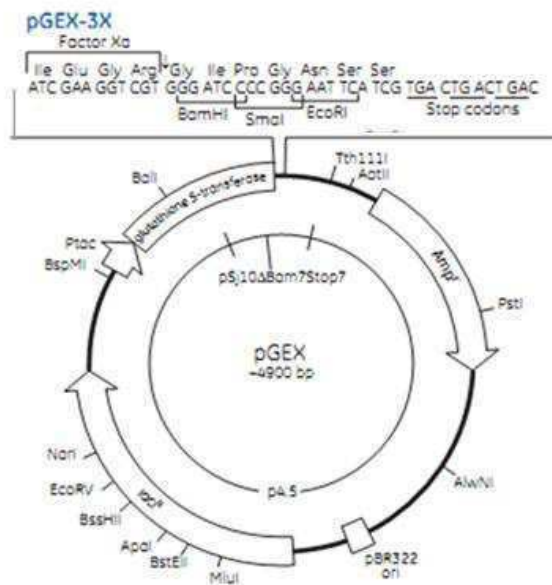


Figura 55. Mapa del plásmido pGEX-3X. La expresión del gen de interés se encuentra regulada por el promotor de *tac*.

- **pRluc-C1**: plásmido convertido al sistema Gateway[®]. Se utiliza para fusionar un ORF de interés con la proteína Rluc en el extremo N-terminal (Figura 56 A).
- **pRluc-N1**: plásmido convertido al sistema Gateway[®]. Se utiliza para fusionar un ORF de interés con la proteína Rluc en el extremo C-terminal (Figura 56 B).
- **pEYFP-C1**: plásmido convertido al sistema Gateway[®]. Se utiliza para fusionar un ORF de interés con la proteína EYFP en el extremo N-terminal (Figura 56 C).
- **pEYFP-N1**: plásmidos convertido al sistema Gateway[®]. Fusión de la proteína EYFP en el extremo C-terminal (Figura 56 D).

Estos 4 plásmidos fueron provistos gentilmente por el Dr. Nelson Dusetti (*Centre de Recherche en Cancérologie, INSERM, Marsella, Francia*).

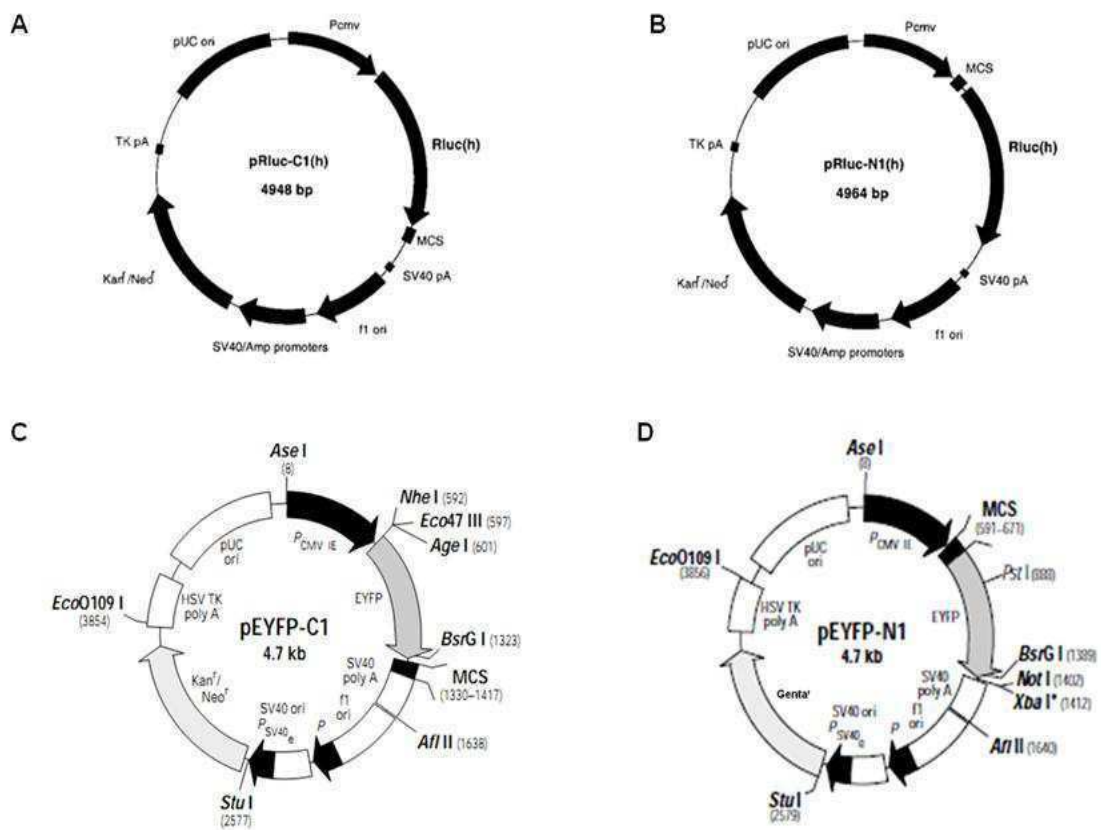


Figura 56. Mapa de los plásmidos destino de BRET. (A) pRluc-C1. (B) pRluc-N1. (C) pEYFP-C1. (D) pEYFP-N1. En todos los casos, el MCS fue reemplazado por el sitio de recombinación Gateway[®].

- **pPC97**: plásmido convertido al sistema Gateway® (Figura 57). Se utiliza para fusionar un ORF de interés con el dominio de unión del factor GAL4. Fue provisto gentilmente por el Dr. Marc Vidal (Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, USA).

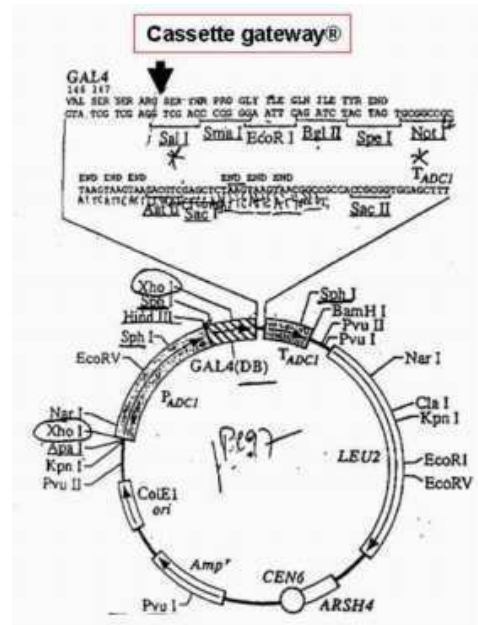


Figura 57. Mapa del plásmido pPC97.

- **pTEX**: plásmido de expresión en *T. cruzi* (Figura 58). Provisto gentilmente por el Dr. Claudio Pereira (Instituto de Investigaciones Médicas, IDIM, Bs. As., Argentina).

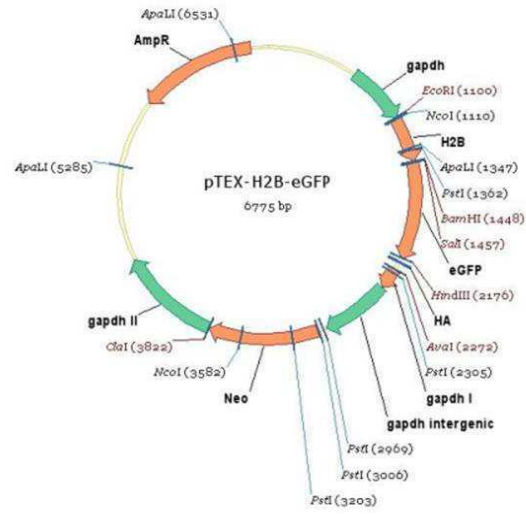


Figura 58. Mapa del plásmido pTEX.

Métodos

1. Mantenimiento de cultivos celulares

1.1. Células HEK 293T

Se crecieron 1×10^6 células en placas de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio completo: DMEM glutaMAX (Gibco), suplementado con SFB 10 % (Natocord), penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 μ g/ml (Sigma), y se cultivaron en una estufa a 37 °C, gaseada con CO₂ 5%. El mantenimiento del cultivo se realizó a través de repiques cuando la monocapa de células alcanzó una confluencia de aproximadamente 80 %. Para despegar las células de la superficie se lavó la placa con 5 ml de PBS pH 7,4 1X y se incubó con 500 μ l de tripsina TripLE™ Express 1X (Gibco) durante 30 seg. La actividad enzimática se interrumpió con 4,5 ml de medio de cultivo completo. Para el repique, se transfirió a una placa nueva 500 μ l del cultivo y se agregó medio de cultivo completo hasta alcanzar un volumen de 10 ml. Se repitió el repique cada 3 días.

1.2. Epimastigotes de *T. cruzi*

Se crecieron 1×10^5 parásitos/ml en medio de cultivo BHT completo (suplementado con SFB 10 %, hemina bovina 0,002 %, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 μ g/ml) y se cultivaron en una estufa a 28 °C. El mantenimiento del cultivo se realizó a través de repiques cuando los parásitos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento (aprox. 1×10^7 células/ml). Para el repique se diluyó el cultivo 1/5-1/10 en medio BHT completo. Se repitió el repique una vez por semana.

2. Transfección celular

2.1. Transfección transitoria de células HEK 293T

Las células se plaquearon en una confluencia del 60 %, aproximadamente. Al día siguiente, se lavaron con PBS pH 7,4 1X y se realizó la transfección. Para transfecciones con el reactivo comercial FuGENE® HD (Promega), se preparó una mezcla que contenía el plásmido, reactivo de transfección (cantidad apropiada según las instrucciones sugeridas por el fabricante) y medio de cultivo Opti-MEM (Gibco) y se incubó por 15 min. a T° ambiente. Para transfecciones con polietilenimina (PEI), se preparó una mezcla de ADN:PEI (1:1) y Opti-MEM, se mezcló con vórtex por 10 seg. y se incubó durante 15 min. a T° ambiente. En

ambos casos, se agregó la mezcla de transfección a las células y se completó con medio Opti-MEM. Luego de 24 horas, las células se lavaron con PBS pH 7,4 1X y se agregó medio de cultivo DMEM GlutaMAX completo. Las células se cosecharon luego de 24 horas.

2.2. Transfección estable de *T. cruzi*

Se cultivaron epimastigotes de la cepa Y hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento y se cosecharon 2×10^8 parásitos/transfección por medio de centrifugación a 2.000 rpm durante 10 min. Se lavó el pellet 2 veces con 10 ml de PBS pH 7,4 1X y se resuspendió en 350 μ l de *buffer* de electroporación ($MgCl_2$ 0,5 mM y $CaCl_2$ 0,1 mM, en PBS pH 7,4 1X). Los parásitos se incubaron en una cubeta de electroporación con 50 ng del plásmido, durante 15 min. en hielo y se electroporaron a 335 V, 24Ω y 1400 μ F con 1 solo pulso. Luego, se recuperaron a T° ambiente durante 10 min., se transfirieron a botellas de cultivo con 3 ml de medio BHT completo y se cultivaron como se explicó anteriormente. Al cabo de 24 horas, se agregó el agente de selección, G418 200 μ g/ml, y se aumentó progresivamente la concentración hasta alcanzar los 500 μ g/ml. Como control de selección, se electroporaron parásitos sin agregar el plásmido. La selección se dio por concluida luego de aproximadamente 10 semanas, cuando murió el 100 % de los parásitos del cultivo control y los otros recuperaron una motilidad y tasa de crecimiento normales.

3. Preparación de bacterias competentes

3.1. Competentes químicas

Se picó una colonia de bacterias *E. coli* a partir de una estría fresca y se inoculó 8 ml de medio de cultivo LB. Se creció durante toda la noche con agitación a 37 °C. El cultivo se utilizó como iniciador para inocular 200 ml de medio LB (dilución 1/25) y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una $DO_{(600\text{nm})}$ de 0,4-0,6 (fase de crecimiento exponencial). Luego, se incubó en hielo por 10 min. y se cosecharon las células por centrifugación a 4.500 rpm durante 20 min. a 4° C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 50 ml de $CaCl_2$ 50 mM frío. Se incubó en hielo por 20 min. y se repitió el paso de centrifugación y resuspensión en $CaCl_2$ 50 mM. Luego de un último paso de centrifugación, se resuspendió el pellet en 4 ml de una solución glicerol 20 % + $CaCl_2$ 50 mM y se alicuotó de a 100 μ l. Se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C.

3.2. Electrocompetentes

Se inoculó 5 ml de medio LB con una colonia de bacterias *E.coli*, proveniente de una estría fresca y se creció durante toda la noche con agitación a 37 °C. El cultivo se diluyó en 500 ml de medio LB (dilución 1/500) y se incubó hasta alcanzar una $DO_{(600nm)}$ de 0,4-0,6. Luego, se incubó en hielo por 30 min. y se centrifugó a 4.500 rpm durante 15 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 500 ml de agua Roux-OCEFA fría y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 ml de agua Roux-OCEFA fría. Luego de un último paso de centrifugación, se resuspendió el pellet en 2 ml de glicerol 10 % en agua, se alicuotó de a 100 μ l y se congeló en nitrógeno líquido. Se almacenó a -70 °C.

4. Transformación bacteriana

4.1. Transformación química

Se incubó 100 μ l de bacterias competentes con 1 μ l de ADN plasmídico (aprox., 200 ng) durante 30 min. en hielo. Se aplicó un *shock* térmico a 42 °C durante 30 seg. y luego, se transfirieron las células rápidamente a hielo por 5 min. Se agregó 300 μ l de medio rico SOC y se incubó 1 hora a 37 °C. A continuación, se centrifugó a 4.500 rpm durante 5 min., se descartó 300 μ l del sobrenadante y se resuspendió el pellet en el volumen remanente. Las bacterias se estriaron en medio LB-agar con el antibiótico de selección para el plásmido con el que fueron transformadas. Se incubó durante 24 horas a 37 °C.

4.2. Electroporación

Se incubó en hielo 100 μ l de bacterias competentes con 1 μ l de ADN plasmídico (aprox., 200 ng), libre de sales, durante 1 min. en una cubeta de electroporación de 0,2 mm de paso. Se aplicó un pulso eléctrico y se recuperaron las bacterias con 800 μ l de medio SOC, del mismo que en la transformación química.

5. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

5.1. Extracción de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*

Se centrifugó un cultivo de 4×10^8 parásitos a 3.000 rpm durante 5 min. y se lavó dos veces con 1 ml PBS pH 7,4 1X. Se lisaron los parásitos con 500 μ l de *buffer* de lisis (Tris-HCl pH 7,6

10 mM; EDTA pH 8 100 mM; y NaCl 100 mM) y se agregó SDS 1 %. A continuación, se agregó proteinasa K 100 µg/ml y se incubó toda la noche a 50-55 °C. Para la extracción de ADN, se agregó 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1) y se mezcló suavemente por inversión. Se centrifugó a 12.000xg durante 5 min. y se recuperó la fase acuosa. Se repitió la extracción hasta la desaparición de las proteínas de la interfase. Se extrajeron los restos de fenol con 1 volumen de cloroformo y se precipitó el ADN con 2,5 volúmenes de etanol frío. Se centrifugó en frío a máxima velocidad por 15 min. y se lavó el pellet con etanol 70 %. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió el pellet en 200 µl de *buffer* TE 1X (Tris-HCl pH 8 10 mM y EDTA 1 mM). Se almacenó a -20 °C.

5.2. Preparación de ADN plasmídico

5.2.1. Minipreparación

Se utilizó el *kit* “QIAprep® Spin Miniprep” (Qiagen) y se siguieron las instrucciones sugeridas por el fabricante.

5.2.2. Midi y maxipreparación

Se utilizó el *kit* “QIAGEN® Plasmid Midi and Maxi” (Qiagen) y se siguieron las instrucciones sugeridas por el fabricante.

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron los ORFs a partir de 100-250 ng de ADN genómico de *T. cruzi*, cepa CL Brener. Se preparó una mezcla que contenía el templado, 10 µl de *buffer* *iProof* HF 5X (Bio-Rad), 2 µl del *primer forward* 20 µM, 2 µl del *primer reverse* 20 µM, 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, Invitrogen), 0,4 µl de *iProof* ADN polimerasa 2 U/µl (Bio-Rad) y agua milli-Q hasta completar un volumen de 50 µl. Para la amplificación se utilizó el siguiente protocolo: desnaturalización inicial, 5 min. a 94 °C; desnaturalización, 30 seg. a 94 °C, *annealing*, 30 seg. a 55-60 °C y extensión, 2 min. a 68 °C (x 30 ciclos); extensión final, 10 min. a 68 °C.

5.4. Colony PCR

Se utilizó esta estrategia para el rastreo de colonias transformadas. Se picaron 3-10 colonias/transformación con una punta estéril y se reestriaron en una placa de LB-agar que contenía el antibiótico correspondiente al plásmido con el que se realizó la transformación. Luego, se depositó el remanente de cada colonia en mezclas de PCR compuestas por los siguientes reactivos: 2,5 µl de *buffer* PCR (-Mg²⁺) 10X (Invitrogen), 0,5 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl del *primer forward* 20 µM, 1 µl del *primer reverse* 20 µM, 0,1 µl de taq ADN polimerasa 5 U/µl (Invitrogen) y 20 µl de agua milli-Q. En todos los casos, uno de los *primers* fue complementario al ORF analizado y el otro, al plásmido. Para la amplificación se siguió el siguiente protocolo: desnaturalización inicial, 7 min. a 95 °C; desnaturalización, 45 seg. a 95 °C, *annealing*, 30 seg. a 45 °C y extensión, 1,5 min. a 72 °C (x 30 ciclos); extensión final, 10 min. a 72 °C.

5.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Se resolvieron los fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa 1 % en *buffer* TAE 1X. Cada 40 ml de agarosa se agregó 3 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml. Las muestras se sembraron junto a estándares de PM (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen) y la corrida electroforética se realizó a voltaje constante (100 V) en una cuba horizontal (Sub-Cell®GT agarose gel electrophoresis system, Bio-Rad) cubierta con *buffer* TAE 1X. El ADN se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta de 365 nm (G-BOX EF, Syngene).

5.6. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para la purificación de ADN se removió la banda de interés del gel de agarosa y se utilizó el *kit* "Wizard® SV Gel Clean-Up System". Se siguieron las instrucciones sugeridas por el fabricante (Promega).

5.7. Adición de dATP en el extremo 5'-terminal del ADN

Se preparó una mezcla que contenía el ADN purificado del gel de agarosa, 5 µl de *buffer* PCR (-Mg²⁺) 10X, 1 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0,2 µl de taq ADN polimerasa 5 U/µl y se completó con agua milli-Q hasta alcanzar un volumen de 50 µl. La mezcla se incubó a 72 °C durante 10 min.

5.8. Digestión con enzimas de restricción

Se preparó una mezcla de 1-5 µg de plásmido, 20 U de la enzima de restricción, 2 µl de *buffer* 10X (específico de cada enzima) y agua milli-Q hasta un volumen de 20 µl. Se incubó durante 2 horas a 37 °C y se confirmó la digestión por electroforesis en gel de agarosa.

5.9. Clonado de ORFs

Se utilizaron ORFs amplificados por PCR y purificados de geles de agarosa. Para el caso de los fragmentos clonados en los vectores pCRTM8/GW/TOPO[®]TA y pGEM[®]-T Easy se agregó dATP en el extremo 5'-terminal, previo al clonado. En todos los casos, se verificó la identidad de los ORFs por secuenciación (servicio de secuenciación, Macrogen).

- **Clonado a pCRTM8/GW/TOPO[®]TA (plásmido de entrada del sistema Gateway[®]):** se empleó este plásmido para el clonado de los siguientes ORFs: P0²¹²⁻³²³, P1α, P1β, P2α, P2β, SF1, FIP1, CpsF30, p14, Mago, Y14, U2AF65⁶¹⁴⁻⁸⁴¹, Sf3b155¹⁻²⁷⁰, PY154, PY293, PY297, PL251, TcCLB.508523.80¹⁻²⁷¹, TcCLB.508523.80 (EcoRI/HindIII), TcCLB.510691.30 y TcCLB.507993.210⁵¹³⁻⁶⁵⁰. Para la reacción de clonado se preparó una mezcla que contenía: 3 µl del producto de PCR fresco, 1 µl de solución salina (provista por el fabricante del vector), 0,5 µl del vector y 1,5 µl de agua milli-Q y se incubó durante 5 min. a T° ambiente. Se transformaron bacterias competentes, cepa DH5α, Top10 o Mach1-T1, con 4 µl de la reacción de clonado y se plaquearon en LB-agar + espectinomicina 100 µg/ml. El rastreo de colonias transformadas se realizó por *colony* PCR con un *primer* complementario al ORF analizado y un *primer* M13.

- **Clonado a pENTRTM/D-TOPO[®] (plásmido de entrada del sistema Gateway[®]):** se empleó este vector para el clonado direccional de WW12¹⁻²¹³ y WW12⁵³⁶⁻⁷³². Los *primers forward* utilizados para la amplificación de estos ORFs se diseñaron con la secuencia CACC en el extremo 5'-terminal, complementaria al plásmido. Se siguió el protocolo de clonado explicado en el punto anterior. Las bacterias transformadas se plaquearon en LB-agar + kanamicina 50 µg/ml.

- **Clonado a pGEM[®]-T Easy:** se empleó este plásmido para el clonado de TcCLB.508523.80. Se utilizaron los reactivos del *kit* pGEM-T[®] Easy (Promega) y se

siguieron las instrucciones sugeridas por el fabricante. Se transformaron bacterias competentes, cepa DH5 α , con 4 μ l de la reacción de clonado y se plaquearon en LB-agar + ampicilina 100 μ g/ml.

5.10. Subclonado de ORFs

- **Subclonado a pDESTM15, pDESTTM17, pPC97 y plásmidos para el BRET (plásmidos destino del sistema Gateway[®]):** los ORFs clonados en plásmidos de entrada del sistema Gateway[®] se transfirieron a plásmidos destino por medio de una reacción de recombinación LR. Para ello, se mezcló 200 ng de cada plásmido y se agregó *buffer* TE pH 8 1X, hasta completar un volumen de 8 μ l. Se agregó 1 μ l de la mezcla enzimática LR ClonaseTM II (Invitrogen) y se incubó durante 1 hora a 25 °C o toda la noche a 16 °C. Para finalizar la reacción, se agregó 1 μ l de proteinasa K 2 μ g/ μ l (Invitrogen) y se incubó a 37 °C por 10 min. Se transformaron bacterias competentes, cepa DH5 α , Top10 o Mach1-T1, con 3 μ l de la reacción de recombinación y se plaquearon en LB-agar + ampicilina 100 μ g/ml, para los plásmidos pDESTTM15, pDESTTM17 y pPC97; LB-agar + kanamicina 50 μ g/ml, para pRLuc-Ct, pRLuc-Nt y pEYFP-Ct; y LB-agar + gentamicina 40 μ g/ml, para pEYFP-Nt. El rastreo de colonias transformadas se realizó por *colony* PCR; los *primers* complementarios a los plásmidos fueron: T7 promotor, para pDESTTM15, pDESTTM17 y pPC97; Luc-C, para pRLuc-C1; Luc-N, para pRLuc-N1; EYFP-C1, para pEYFP-C1 y EYFP-N, para pEYFP-N1.

- **Subclonado a pGEX-3X:** se digirieron los plásmidos pGem-T[®]Easy-TcCLB.508523.80 y pGEX-3X con la enzima de restricción EcoRI y se resolvieron los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa. Luego, se purificaron las bandas correspondientes al inserto TcCLB.508523.80 y al plásmido pGEX-3X linealizado. Para el subclonado del inserto se utilizó una relación molar inserto:vector de 3:1 y se preparó la siguiente reacción de ligación: 1 μ l de *buffer* de ligación 10X, vector, inserto, 0,3 μ l de T4 ADN ligasa 3 U/ μ l (Promega) y agua milli-Q hasta completar un volumen de 10 μ l. Se incubó toda la noche a 16 °C. Se transformaron bacterias competentes, cepa DH5 α , con 3 μ l de la reacción de ligación y se plaquearon en LB-agar + ampicilina 100 μ g/ml.

- **Subclonado a pTEX:** se utilizó este plásmido para el subclonado de TcCLB.508523.80 (EcorI/HindIII). Se digirieron los plásmidos pCR8/GW/TOPO-TcCLB.508523.80 (EcorI/HindIII)

y pTEX-HA-H₂b-eGFP con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII y se resolvieron los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa. Luego, se purificaron las bandas correspondientes al inserto TcCLB.508523.80 (EcoRI/HindIII) y al plásmido pTEX-HA linealizado. Para la ligación, se utilizó una relación molar inserto:vector, 10:1 y se siguió el protocolo explicado en el punto anterior. Las bacterias transformadas se plaquearon en LB-agar + ampicilina 100 µg/ml y el rastreo de colonias transformadas se realizó por digestión con las enzimas de restricción EcoRI (NEB) y HindIII (Fermentas).

5.11. Mutagénesis sitio dirigida

Para introducir una mutación puntual en el codón que codifica para la arginina de la posición 91 de TcCLB.508523.80 y generar un nuevo codón que codifica para una lisina, se realizó una PCR con los *primers* Tc.8523R91K *forward* y Tc.8523R91K *reverse* y se utilizó como templado 200 ng del plásmido pCR8/GW/TOPO+TcCLB.508523.80¹⁻²⁷³. Se incubó el producto de PCR durante 3 horas a 37 °C con una mezcla que contenía: 5 µl de NEB *buffer* 4 10X, 0,5 µl de BSA 100X y 1 µl de DpnI 20 U/µl (NEB), enzima que cliva el ADN metilado correspondiente al templado. Luego, se transformaron bacterias competentes, cepa Mach1-T1, con 4 µl del producto de la reacción y se plaquearon en LB-agar + espectinomicina 100 µg/ml. El rastreo de colonias transformadas se realizó por *colony* PCR con un *primer* complementario al ORF analizado y un *primer* M13. Se verificó la inserción de la mutación por secuenciación (servicio de secuenciación, Macrogen).

6. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias

6.1. Prueba piloto de expresión

Para cada proteína se realizó una prueba piloto de expresión a fin de determinar el tiempo óptimo de inducción. Para ello, se inoculó 5 ml de medio líquido LB-ampicilina 100 µg/ml, con una colonia de *E. coli*, cepa BL21, transformada con el plásmido de expresión. Se creció el cultivo toda la noche a 37 °C con agitación y luego, se utilizaron 800 µl para inocular 20 ml de medio LB-ampicilina 100 µg/ml (dilución 1/25). Cuando el cultivo alcanzó una DO_(600 nm) de 0,4-0,6 se retiró una alícuota de 1 ml, que representó el tiempo cero de inducción. Se indujo la expresión de las proteínas con ITPG 1 mM y se tomó 1 ml de alícuota a distintos intervalos de tiempo (1, 2, 4 y 16 horas). Las alícuotas se centrifugaron a 10.000 rpm por 5 min. y se lisó el pellet en 250 µl de *buffer* de siembra Laemmli 1X. Se sonicó el lisado 3 veces a una

amplitud de 20 %, durante 10 seg., intercalando 10 seg. de incubación en hielo. Para el análisis, las muestras se hirvieron durante 5 min. y se sembraron en un gel SDS-PAGE 10-12 %.

6.2. Obtención de proteínas recombinantes

Una vez establecido el tiempo de inducción óptimo para cada proteína, se inoculó 15 ml de medio LB-ampicilina 100 µg/ml con una colonia transformada con el plásmido de expresión y se incubó toda la noche a 37 °C. Luego, se utilizó ese cultivo para inocular 100 ml de LB-ampicilina 100 µg/ml (dilución 1/20) y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una $DO_{(600\text{nm})}$ de 0,4-0,6. En general, se indujo la expresión de las proteínas con IPTG 1 mM durante 4 horas a 37 °C. Para las proteínas GST-TcCLB.508523.80 y GST-PKA-R1β, se utilizó IPTG 0,1 mM y se incubó toda la noche a 18 °C. En todos los casos, se centrifugaron los cultivos a 4.500 rpm por 15 min. a 4 °C y se reservó el pellet.

6.3. Lisis bacteriana

6.3.1. Lisis en condiciones no desnaturizantes

Se resuspendió el pellet en 8 ml de una solución TBS (Tris-HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM y $MgCl_2$ 5 mM) y se agregó un coctel de inhibidores de proteasas 1X (Roche). Luego, se agregó 150 µl de lisozima 10 mg/ml, 120 µl de β-mercaptoetanol 1 M, 700 µl de Sarkosyl 10 % y se mezcló por inversión. Se incubó en hielo durante 15 min. y se sonicó 4 veces a una amplitud de 50 % durante 20 seg., intercalando 20 seg. de incubación en hielo. A continuación, se centrifugó a 9.500 rpm por 20 min. a 4 °C y se descartó el pellet. Se agregó al sobrenadante 1 ml de Tritón X-100 20 % y se incubó 30 min. a T° ambiente. Para las proteínas recombinantes que no fueron purificadas, se agregó glicerol 15 %, se alicuotó de a 1 ml y se almacenó a -70 °C. Para las proteínas que se purificaron, se reservó el sobrenadante y se continuó con el protocolo de purificación (ver más abajo).

6.3.2. Lisis en condiciones desnaturizantes

Se empleó este protocolo exclusivamente para la proteína His-WW12¹⁻²¹³. Se resuspendió el pellet en 8 ml de *buffer* guanidinio (hidrocloruro de guanidina 6 M, NaH_2PO_4 pH 7,8 20 mM y NaCl 500 mM) y se sonicó 6 veces a una amplitud de 65 % durante 10 seg., intercalando

10 seg. de incubación en hielo. Luego, se centrifugó a 3.000 rpm por 1 min. a 4 °C y se reservó el sobrenadante para continuar con el protocolo de purificación (ver más abajo).

6.4. Purificación

6.4.1. Purificación de proteínas de fusión a GST por resinas de agarosa-GSH

Se empleó este protocolo para las proteínas GST-TcCLB.508523.80 y GST-PKA-R1 β . Se lavó 1 ml de una resina de agarosa-GSH (Sigma) con 5 ml de TBS frío y se centrifugó a 2.500 rpm durante 4 min. a 4 °C. Se repitió el lavado 3 veces y se descartó el sobrenadante cada vez. A continuación, la resina se incubó con el sobrenadante obtenido de la lisis bacteriana, durante 30 min. con agitación a 4 °C y luego, se centrifugó a 2.500 rpm durante 4 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó la resina 2 veces con TBS frío. Para la elusión de las proteínas, se agregó 800 μ l de GSH 10 mM en TBS y se centrifugó a 2.500 rpm, por 4 min. a 4 °C. Se repitió la elusión 3 veces y se colectó el eluido cada vez. Se agregó a los eluidos glicerol 15 %, se alicuotó de a 100 μ l y se almacenó a -70 °C.

6.4.2. Purificación de proteínas de fusión a un *tag* de histidinas por resinas de agarosa Ni-NTA

Se empleó este protocolo para las proteínas His-WW12¹⁻²¹³ e His-Sf3b155¹⁻²⁷⁰. Se lavó 1 ml de una resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) con 5 ml de TBS frío y se centrifugó a 3.000 rpm, 5 min. a 4 °C. Se repitió el lavado 3 veces y se descartó el sobrenadante cada vez. A continuación, la resina se incubó con el sobrenadante proveniente de la lisis bacteriana, durante 2 horas con agitación a 4 °C y luego, se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó la resina 3 veces con una solución de TBS frío + β -mercaptoetanol 5 mM + imidazol 50 mM. Para la elusión de las proteínas, se agregó 1 ml de *buffer* de elusión (TBS + β -mercaptoetanol 5 mM + imidazol 300-500 mM), se incubó durante 20 min. a 4 °C y se centrifugó a 3.000 rpm por 5 min. a 4 °C. Se repitió la elusión 3 veces y se colectó el eluido cada vez. Se agregó a los eluidos glicerol 15 %, se alicuotó de a 100 μ l y se almacenó a -70 °C.

7. Análisis de proteínas

7.1. Determinación de la concentración proteica

Se utilizó un micrométodo adaptado del protocolo original descrito por Bradford (Bradford 1976): en placas de 96 pocillos se incubó 10 µl/pocillo de una dilución 1/20 de cada muestra y se agregó 200 µl/pocillo del reactivo de Bradford (Bio-Rad). Se realizó un duplicado de cada muestra y se midió absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (PHERAstar FS, BMG Labtech). Para la construcción de una curva de calibración se utilizó como estándar a la proteína BSA (0,2-1 mg/ml) y sobre la base de la misma se determinó la concentración proteica de las muestras.

7.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes se realizó en geles planos de poliacrilamida, conforme a la técnica descrita por Laemmli, 1970 (Laemmli 1970). El gel separador se preparó con poliacrilamida 10-12%. Para un volumen de 10 ml de gel separador se preparó una mezcla que contenía: 3,3-4 ml de acril-bisacrilamida 30% (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1), 2,5 ml de Tris-HCl pH 8,8 1,5 M, 100 µl de SDS 10%, 100 µl de persulfato de amonio 10%, 7 µl de Temed y agua destilada hasta completar el volumen final. Para un volumen de 5 ml de gel concentrador: 1 ml de acril-bisacrilamida 30% (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1), 1,67 ml de Tris-HCl pH 6,8 0,5 M, 50 µl de SDS 10%, 50 µl de persulfato de amonio 10%, 3,5 µl de Temed y agua destilada hasta completar el volumen final. La corrida electroforética se realizó a T° ambiente en una cuba vertical (sistema Mini-Protean® Tetra Cell, Bio-Rad) cubierta con *buffer* de corrida, a voltaje constante de 80 V para el gel concentrador y 100 V, para el separador. Las muestras analizadas se suplementaron con *buffer* de siembra Laemmli y se hirvieron durante 5 minutos previo a la electroforesis. En todas las corridas se incluyeron mezclas de estándares de PM (PageRuler™ Prestained, Thermo Scientific).

7.3. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

7.3.1. Tinción con azul de Coomassie

Finalizada la electroforesis, el gel se incubó durante 30 min. con una solución de tinción que contenía el colorante azul de Coomassie G-250 3 g/L. Se lavó con agua destilada y se destiñó con metanol acético.

7.3.2. Tinción con azul de Coomassie en suspensión coloidal

Esta metodología se utilizó para la tinción de proteínas que fueron escindidas del gel y analizadas por espectrometría de masa, MALDI-TOF. Para fijar las proteínas, se incubó el gel con una solución fijadora (etanol 30 % + ácido fosfórico 2 %) durante toda la noche con agitación. Se lavó 3 veces con agua destilada por 30 min. y se agregó una solución de tinción (metanol 18 % + sulfato de amonio 17 % + ácido fosfórico 2 %). Se incubó durante 1 hora con agitación y se agregó 0,5 g/L del colorante azul de Coomassie G-250. Se agitó suavemente durante 2 días hasta observar la tinción de las proteínas.

7.4. Western blot

Luego del SDS-PAGE, las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF (Amersham™ Hybond, GE Healthcare), estas últimas, previamente hidratadas con metanol. Para la electrotransferencia, se apilaron en orden (del cátodo al ánodo) los siguientes elementos: esponjas (provistas por el equipo de transferencia), papel de filtro Whatman, gel, membrana, papel de filtro y esponjas. Previamente, se embebieron todos los elementos en *buffer* de transferencia. El montaje se ensambló en un cartucho de transferencia y se colocó, junto con un bloque de hielo, en una cuba vertical (sistema Mini-Protean® Tetra Cell, Bio-Rad) cubierta con *buffer* de transferencia frío. Se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 90 min. Finalizada la transferencia, se incubó la membrana durante 1 hora a T° ambiente con una solución de bloqueo TTBS-leche (Tris-HCl pH 7,5 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,05 % y leche en polvo descremada 5 %) y luego, se incubó con una dilución del anticuerpo primario, con agitación, durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos primarios se diluyeron en una solución compuesta por BSA 1 %, gelatina 3 %, azida sódica 0,05 %, y Tween 20 0,1 % en PBS 1X. La dilución de los anticuerpos primarios fue la siguiente: anti *tag* de histidinas, 1/1.000 o 1/2500; anti-GST, 1/2.500; anti-WW12, 1/500; y anti-TcCLB.508523.80, 1/1.000. Finalizada la incubación, se lavó la membrana 3 veces con TTBS durante 10 min. y a continuación, se incubó durante 1 hora a T° ambiente con el anticuerpo secundario (diluido en solución de bloqueo): anti-IgG de ratón

acoplado a peroxidasa, 1/10.000 o 1/15.000; y anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, 1/15.000. Luego, se lavó la membrana 3 veces con TTBS y se realizó un último lavado con TBS. El revelado de las bandas se realizó por quimioluminiscencia; para ello, se incubó la membrana durante 3 min. con una mezcla 1:1 de una solución luminol:Tris-HCl pH 8 0,1 M/H₂O₂ y se detectaron las bandas reactivas con placas autorradiográficas. Para el revelado de los ensayos de unión a AMPc se utilizó el *kit* comercial, SuperSignal™ (Pierce® Thermo Scientific).

7.5. Dot blot

Se sembró en membranas de nitrocelulosa 300-800 ng de muestra (en un volumen máximo de 20 µl) y se incubó con 1 ml de solución de bloqueo durante 1 hora a T° ambiente. Finalizado el bloqueo, se incubó con 1 ml de una dilución del anticuerpo primario, con agitación, durante toda la noche a 4 °C. Las diluciones de los anticuerpos primarios fueron las siguientes: anti-WW12, 1/500 y anti-TcCLB.508523.80, 1/1.000. A continuación, se lavó la membrana 3 veces con 1 ml de TTBS por 10 min. y se incubó durante 1 hora a T° ambiente con 1 ml del anticuerpo secundario (diluido en solución de bloqueo): anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa, 1/10.000 y anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, 1/15.000. La membrana se lavó 3 veces con TTBS y se realizó un último lavado con TBS. El revelado de las bandas se realizó por quimioluminiscencia, como se explicó anteriormente.

8. Ensayo de BRET

8.1. Curva de saturación del dador de energía en células vivas

Se plaquearon 500.000 células HEK 293T/pocillo en placas de 12 pocillos y luego de 24 horas se cotransfectaron con un total de 0,8 µg de los plásmidos codificantes para el dador y el receptor de energía. Específicamente, para cada par de interacción se utilizó una cantidad constante del plásmido que contenía al dador (0,4 µg/pocillo) y cantidades crecientes del plásmido que contenía al receptor (0,1; 0,2; 0,3 y 0,4 µg/pocillo) y se completó a 0,8 µg con un plásmido vacío, cuando fue necesario. Luego de 24 horas, se repicaron las células a 3 pocillos de placas blancas de 96 pocillos, a fin de obtener triplicados de cada punto de la curva. Transcurridas 24 horas, se agregó 60 µl del sustrato permeable de la luciferasa, coelenterazina h (Invitrogen) 5 µM en PBS pH 7,4 1X y se incubó durante 15 min. a 37 °C en oscuridad. Se midió emisión de luminiscencia y fluorescencia cuasi-simultáneamente con el

equipo Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold technologies). Los filtros de emisión fueron los siguientes: 485 ± 10 nm, para luciferasa y $530 \pm 12,5$ nm, para EYFP. Células que expresaban solo el dador de energía fueron utilizadas para determinar la señal de fondo, generada como consecuencia del solapamiento entre el espectro de emisión de Rluc y el de excitación de EYFP. La señal de BRET se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{BRET (mBRET)} = \left[\frac{\text{Fluorescencia}_{530\text{nm}}}{\text{Luminiscencia}_{485\text{nm}}} - \frac{\text{Fluorescencia}_{530\text{nm}}}{\text{Luminiscencia}_{485\text{nm}}_0} \right] \times 1000$$

Donde: "0" corresponde a los valores de fluorescencia y luminiscencia para células que expresaban solo el dador de energía (señal de fondo).

8.2. Curva de saturación del dador de energía en lisados celulares

Se plaquearon 5×10^6 células HEK 293T/placa en placas de 10 cm de diámetro y 24 horas más tarde se transfectaron con 12 μg /placa de un plásmido de BRET. Luego de 48 horas, se lisaron mecánicamente (ver más abajo) y se cuantificó la concentración proteica. Se coincubó durante 30 min., en pocillos de placas blancas de 96 pocillos, una cantidad constante del dador de energía con cantidades crecientes de proteínas de un lisado que contenía al aceptor (5, 15, 20 y 30 μg /pocillo) y se completó a un volumen de 50 μl con *buffer* de lisis hipotónico (Hepes 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, DTT 1 M y coctel de inhibidores de proteasas 1X). Se realizó un duplicado de cada punto de la curva y se agregó 50 μl de coelenterazina h 5 μM , preparada en *buffer* de lisis hipotónico. Se incubó durante 3 min. en oscuridad y se midió emisión de luminiscencia y fluorescencia cuasi-simultáneamente. La señal de fondo se calculó para el dador de energía en ausencia del lisado que contenía al aceptor. Para las mediciones realizadas con el equipo Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold technologies), la cantidad de dador de energía para cada punto fue la correspondiente a 150.000 UA de actividad luciferasa/pocillo; para el equipo PHERAstar FS (BMG Labtech), 15.000 UA de actividad luciferasa/pocillo. Los filtros de emisión para este equipo fueron: 475 ± 30 nm, para luciferasa y 535 ± 30 nm, para EYFP. La señal de BRET se calculó como se explicó anteriormente.

8.2.1. Lisis celular mecánica

Las células transfectadas con los plásmidos de BRET se lavaron 2 veces con 5 ml de PBS pH 7,4 1X y se colectaron con 1,5 ml de PBS pH 7,4 1X, subiendo y bajando el volumen,

reiteradas veces. Luego, se centrifugaron a 450 x g durante 5 min. a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se estimó el volumen celular del pellet (VCP) y se resuspendió suavemente en 5 x VCP de *buffer* de lisis hipotónico. A continuación, las células se incubaron durante 15 min. en hielo y se centrifugaron a 420 x g por 5 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el pellet en 2 x VCP de *buffer* de lisis hipotónico. Para la lisis, se utilizó una jeringa de 1 ml con aguja de 27 G, 3/4", se aspiró el volumen y se eyectó rápidamente. Se repitió el procedimiento 5 veces y se centrifugó a 11.000 x g por 20 min. a 4 °C. Se alicuotó el sobrenadante de a 30 µl y se congeló en nitrógeno líquido. Se almacenó a -70 °C.

8.2.2. Curva de actividad luciferasa

Se incubó durante 30 min. en pocillos del placas blancas de 96 pocillos, cantidades crecientes de los lisados que contenían al dador de energía (0, 2,5, 10, 15, 20 y 30 µg) y se completó a un volumen de 50 µl con *buffer* de lisis hipotónico. Se realizó un duplicado de cada punto de la curva y se agregó 50 µl de coelenterazina h 5 µM, preparada en *buffer* de lisis hipotónico. Se incubó por 3 min. en oscuridad y se midió emisión de luminiscencia. A partir de estas curvas se determinó, para cada lisado, la concentración proteica que correspondía a 15.000 o 150.000 UA de actividad luciferasa, utilizadas en las curva de saturación del dador de energía.

8.3. Rastreo de principios activos mediante ensayos de BRET en lisados celulares

8.3.1. Ensayo de desplazamiento de la interacción Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc/p14-EYFP

Se coincubó durante 30 min. en pocillos de placas blancas de 96 pocillos, 15.000 UA del dador de energía (Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc) con 20 µg de un lisado que contenía al aceptor (p14-EYFP), en presencia o ausencia de 5 µg de la proteína purificada His-Sf3b155¹⁻²⁷⁰. Se completó el volumen a 50 µl con *buffer* de lisis hipotónico. Se realizó un duplicado de cada punto y se agregó 50 µl de coelenterazina h 5 µM, preparada en *buffer* de lisis hipotónico. Se midió emisión a 475 ± 30 y 535 ± 30 nm cuasi-simultáneamente y se calculó la señal de BRET como se explicó anteriormente.

8.3.2. Control de emisión del dador de energía

Se incubó en pocillos de placas blancas de 96 pocillos, 15.000 UA del dador de energía (Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc) con 1 μ l de cada extracto analizado (2, 20 y 200 μ g/ml) o 1 μ l de la solución vehículo (DMSO), como control. Se completó el volumen a 50 μ l con *buffer* de lisis hipotónico. Luego de 30 min., se agregó 50 μ l de coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 ± 30 nm. Se realizó un duplicado de cada punto.

8.3.3. Control de emisión del aceptor de energía

Se incubó en pocillos de placas blancas de 96 pocillos, 3 μ g de un lisado que contenía al aceptor de energía (p14-EYFP) con 1 μ l de cada extracto analizado (2, 20 y 200 μ g/ml) o 1 μ l de DMSO (control). Se completó el volumen a 100 μ l con *buffer* de lisis hipotónico. Luego de 30 min., se excitó a 485 ± 12 nm y se midió emisión a 535 ± 30 nm. Se realizó un duplicado de cada punto.

8.3.4. Rastreo en condiciones de no saturación del dador de energía

Se coincubó en pocillos de placas blancas de 96 pocillos, 15.000 UA del dador de energía (Sf3b155¹⁻²⁷⁰-Rluc) con 3 μ g de un lisado que contenía al aceptor (p14-EYFP), en presencia de 1 μ l de cada extracto analizado (2, 20 y 200 μ g/ml) o de 1 μ l de DMSO (control). Se completó el volumen a 50 μ l con *buffer* de lisis hipotónico. Luego de 30 min., se agregó 50 μ l de coelenterazina h 5 μ M y se midió emisión a 475 ± 30 y 535 ± 30 nm, cuasi-simultáneamente. Se realizó un duplicado de cada punto. La señal de BRET se calculó como se explicó anteriormente.

8.3.5. Rastreo en condiciones de saturación del dador de energía

Se repitió el protocolo del rastreo en condiciones de no saturación, pero se utilizó 20 μ g de un lisado que contenía al aceptor de energía (p14-EYFP).

8.3.6 Análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de la señal de cada tratamiento respecto del control y el resultado se expresó como la media \pm SEM de n experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con la prueba T de student para una muestra, considerando la hipótesis nula: $\mu_0 = 100$. Se empleó el *software* GraphPad Prism versión 5.03. Se definió la significancia estadística como $p < 0,05$.

9. Ensayo de crecimiento de epimastigotes en presencia de un extracto de *Nardophyllum bryoides*

Se incubaron cultivos de $3,3 \times 10^6$ /ml epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y, en fase exponencial de crecimiento, con concentraciones crecientes de un extracto de *Nardophyllum bryoides* (2, 20 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Se tomaron alícuotas cada 24 horas y se monitoreó la proliferación durante 3 días por conteo de los parásitos en cámara de Neubauer. Cada punto de la curva se evaluó por triplicado y los resultados se expresaron como la media + SEM de 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Anova de una vía, y para los contrastes *a posteriori*, un *test* de Tukey de comparaciones múltiples. Se empleó el *software* GraphPad Prism versión 5.03. Se definió la significancia estadística como $p < 0,05$.

10. Ensayo de viabilidad celular por tinción con cristal violeta

Se plaquearon 15.000 células HEK 293T/pocillo en placas de 96 pocillos y luego de 24 horas se agregaron concentraciones crecientes (0, 20, 50, 100, 200 y 500 $\mu\text{g/ml}$) de un extracto de *Nardophyllum bryoides*. Las células se incubaron durante 24 horas y luego, se lavaron con PBS pH 7,4 1X y se fijaron a -20°C durante 10 min con 20 μl /pocillo de metanol. A continuación, se lavaron con agua destilada 3 veces y se secaron a T° ambiente. Para la tinción, se agregó 50 μl /pocillo del colorante cristal violeta 0,5 % y se incubó durante 20 min. a T° ambiente. Se retiró el exceso de colorante, se lavó con agua reiteradas veces y se incubó toda la noche a T° ambiente, en cámara húmeda. Para disolver los cristales, se agregó 100 μl /pocillo de ácido acético 10 % y se incubó durante 30 min. a T° ambiente. Se midió absorbancia a 595 nm en el luminómetro Glomax multidetection system (Promega).

Para el cálculo de la IC₅₀, se realizó una curva de absorbancia_{595 nm} en función del logaritmo de la concentración del extracto y se empleó el *software* GraphPad Prism versión 5.03.

11. Obtención de anticuerpos policlonales (protocolo de inmunización)

Se utilizaron 3 ratones hembras, cepa CF1, entre 6-10 semanas de edad. Para la obtención de sueros preinmune se realizó un sangrado por punción submaxilar (aprox., 50 µl de sangre). La inmunización se realizó por inyección subcutánea con aproximadamente 50 µg del antígeno purificado (His-WW12¹⁻²¹³). Los animales recibieron 3 dosis, una cada 15 días; la primera dosis se administró en presencia del adyuvante completo de Freund, mientras que las otras, con el adyuvante incompleto. El adyuvante y la proteína se agregaron en igual volumen, emulsionados en vórtex hasta observar una sola fase. Luego de 15 días de la última dosis, los ratones fueron sangrados a blanco por punción cardíaca; se colectó la sangre, se incubó a 37 °C durante 1 hora y luego, a 4 °C por 15 min. Se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. y se obtuvo el suero (sobrenadante).

12. Precipitación diferencial

12.1. Analisis de interacciones proteína-proteína

- **Proteína WW12 y proteínas con motivos ricos en prolina (PY154, PY293, PY297 y PL251):** Se lavó 80 µl de una resina de agarosa-GSH con 1 ml de TBS (Tris-HCl pH 7,4 50 mM y NaCl 50 mM) y se centrifugó a 2.500 rpm, durante 4 min. a 4 °C. Se repitió el lavado 3 veces y se incubó la resina durante 2 horas a 4 °C, en agitación, con un lisado de bacterias que contenía 12,5 µg de la proteína "carnada" GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² o la proteína GST (control). Luego de preconjugar las proteínas a la resina, se lavó 3 veces con 1 ml de TBS + β-mercaptoetanol 5 mM, se centrifugó a 2.500 rpm durante 4 min. a 4 °C y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregó 1 ml de un lisado bacteriano enriquecido en las proteínas His-PY154, His-PY293, His-PY297 o His-PL251 (aprox., 25 µg de proteína) y se incubó toda la noche a 4 °C. Se repitieron los lavados y la centrifugación y se descartó el sobrenadante. Para la elusión de las proteínas, se agregó 1 volumen de *buffer* de siembra Laemmli 2X y se hirvió durante 5 min. Se analizó el resultado por Western blot con un anticuerpo anti *tag* de histidinas.

Para los casos en los que se realizó el ensayo de precipitación diferencial recíproco (GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PY154 y GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³²/His-PY293), se empleó una resina de agarosa

Ni-NTA y se repitió el protocolo. En estos casos, se preconjugó a la resina las proteínas His-PY154 e His-PY293 y se incubó con un lisado de bacterias que contenía 12,5 µg de la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³². Se analizó el resultado por Western blot con un anticuerpo anti-GST.

- **Búsqueda de pares de interacción para la proteína WW12 en lisados celulares:** se preconjugó la proteína GST-WW12⁵³⁶⁻⁷³² a una resina de agarosa-GSH, como se explicó en el punto 12.1. Se incubó la resina con un lisado de 5×10^8 parásitos del estadio epimastigote durante toda la noche a 4 °C. Se lavó 3 veces con 1 ml de PBS 1X + β-mercaptoetanol 5 mM y se centrifugó a 2.500 rpm por 4 min. a 4 °C. Como control, se repitió el ensayo en ausencia del lisado de parásitos. Para la elusión de las proteínas, se agregó un volumen de *buffer* de siembra Laemmli 2X y se hirvió durante 5 min. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE 10 % y el gel se tiñó por el método de azul de Coomassie en suspensión coloidal, indicado para el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

- **Búsqueda de pares de interacción para la proteína TcCLB.508523.80 en lisados celulares:** se lavó 160 µl de una resina de agarosa-AMPc (Sigma) con 1 ml de TBS y se centrifugó a 2.500 rpm, durante 4 min. a 4 °C. Se repitió 3 veces el lavado y luego, se incubó durante 2 horas a 4 °C, en agitación, con un lisado de bacterias que contenía 10 µg de la proteína “carnada”, TcCLB.508523.80, a fin de preconjugarla a la resina. Finalizada la incubación, se lavó 3 veces con 1 ml de TBS + β-mercaptoetanol 5 mM, se centrifugó a 2.500 rpm durante 4 min. a 4 °C y se descartó el sobrenadante. A continuación, se incubó la resina durante toda la noche a 4 °C con un lisado de 8×10^8 parásitos del estadio trypomastigote y se repitieron los 3 lavados y la centrifugación. Para la elusión de las proteínas, se agregó un volumen de *buffer* de siembra Laemmli 2X y se incubó a 60 °C durante 10 min. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE 12 % y el gel se tiñó por el método de azul de Coomassie en suspensión coloidal.

12.2. Ensayo de unión a AMPc

Este ensayo se realizó con proteínas que contenían CBDs purificadas y con lisados bacterianos enriquecidos en proteínas que contenían CBDs. En todos los casos, las proteínas se encontraban en *buffer* de unión (TBS pH 7,4, β-mercaptoetanol 5 mM, Sarkosyl 0,6 % y Tritón-X 100 2 %).

Se lavó 160 µl de una resina de agarosa-AMPC con 1 ml de TBS y se centrifugó a 2.500 rpm durante 4 min. a 4 °C. Se repitió el lavado 3 veces y se agregó 1 ml de proteína recombinante purificada (500 ng) o 1 ml de lisado bacteriano enriquecido en la proteína recombinante (1-5 µg). Se incubó durante 2 horas a 4 °C, con agitación, y se lavó la resina 3 veces con 1 ml de TBS + β-mercaptoetanol 5 mM y un último lavado con TBS. Para la elusión de las proteínas, se agregó 1 volumen de *buffer* de siembra Laemmli 2X y se incubó a 60 °C durante 10 min. Las proteínas se resolvieron por SDS-PAGE 10-12% y se analizó el resultado por Western blot con un anticuerpo anti-GST o anti *tag* de histidinas.

12.2.1. Ensayo de desplazamiento con nucleótidos libres

Se repitió el ensayo de unión a AMPC, agregando al *buffer* de unión nucleótidos libres (AMPC, GMPc o AMP, Sigma) en una concentración 1 o 10 mM, según corresponda.

13. Inmunofluorescencia indirecta

Se colocaron 1×10^6 epimastigotes/laminilla sobre laminillas de 12 mm que contenían Poli-D-lisina 40 µg/ml (Sigma) y se incubaron durante 20 min a T° ambiente. Una vez adheridos al vidrio, se lavaron 3 veces con PBS pH 7,4 1X y se fijaron con 500 µl de paraformaldehído 4% en PBS 1X durante 30 min. Se repitió los lavados y se agregó NH₄Cl 25 mM en PBS 1X, para reducir la fluorescencia basal. Luego de 20 min., se lavó 3 veces con PBS pH 7,4 1X. Para la permeabilización y el bloqueo de los parásitos, se agregó 200 µl de una mezcla de BSA 5% y saponina 0,5% en PBS 1X y se incubó durante 30 min. Luego, se lavó 3 veces con PBS pH 7,4 1X y se agregó 50 µl del anticuerpo primario (anti-WW12: dilución 1/100, en solución de bloqueo). Se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4 °C y finalizada la incubación, se lavaron las laminillas 3 veces con PBS pH 7,4 1X. A continuación, se agregó 50 µl del anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón, conjugado a Alexa Fluor 555®: dilución 1/1.000, en solución de bloqueo) y se incubó durante 1 hora en oscuridad. Se lavó con PBS pH 7,4 1X y se agregó 3 µl de DAPI 1 µg/ml. Finalmente, las laminillas se montaron sobre portaobjetos que contenían 5 µl de solución de montaje FluorSave™ (Merk Millipore) y se selló con esmalte. Para el control negativo, se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Los preparados se analizaron con el microscopio confocal Olympus FV1000.

14. Doble híbrido en levaduras

14.1. Preparación de levaduras competentes

Se picó una colonia de levaduras *S. cerevisiae*, cepa MaV203, a partir de una estría fresca y se inoculó 1 ml de medio de cultivo YPAD líquido. Se creció a 30 °C con agitación durante toda la noche. Al día siguiente, se llevó el cultivo a un volumen final de 6 ml con medio YPAD y se creció durante 5 horas a 30 °C. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 4 min. y se lavó el pellet con 4 ml de agua milli-Q. Se repitió la centrifugación y se resuspendieron las células en 700 µl de acetato de litio en TE 1X. Se incubó a 30 °C con agitación durante 20 min.

14.2. Transformación de levaduras

La transformación se realizó de manera secuencial, primero con el plásmido pPC97 (fusión al dominio de unión de GAL4) y luego con pDESTTM22 (fusión al dominio de activación de GAL4).

Para la transformación con pPC97 + WW12⁵³⁶⁻⁷³² se centrifugaron 100 µl de levaduras competentes a 7.000 rpm durante 1 min. y se resuspendió el pellet en 178 µl de una solución de transformación (150 µl de PEG 40 %, 18 µl de acetato de litio 10X, 2 µl de ADN de esperma de salmón 10 mg/ml y 8 µl de agua milli-Q), emulsionada con vórtex. A continuación, se agregó 200 ng del plásmido y se incubó a 42 °C durante 40 min. Se centrifugó brevemente y se resuspendió el pellet en 100 µl de agua milli-Q. Las células se estriaron en una placa de petri con medio SC-agar (L) y se incubó a 30 °C por 72 horas.

Para la transformación con pDESTTM22 + biblioteca ADNc epimastigotes se picó una colonia transformada con pPC97 + WW12⁵³⁶⁻⁷³² y se inoculó 1 ml de medio líquido SC(L). Se repitió el protocolo de preparación de levaduras competentes. Se siguió el protocolo de transformación, utilizando todo el volumen de levaduras competentes, 300 µl de la solución de transformación y 2,5 µg del plásmido. Las levaduras se resuspendieron en 800 µl de agua milli-Q y se estriaron en 10 placas de 14 cm de diámetro, con medio SC-agar (LW). Se incubó a 30 °C durante 72 horas.

14.3. Rastreo de interacciones por activación de genes reporteros

14.3.1. Ensayo de actividad de β-galactosidasa por inducción del gen *lacZ*

La enzima β-galactosidasa cataliza la hidrólisis del sustrato X-gal, generando un compuesto azul insoluble; su expresión, es inducida por la reconstitución del factor de

transcripción GAL4. Para el ensayo, se transfirieron las colonias obtenidas de la transformación secuencial a membranas de sílica-gel. Luego, las membranas se apoyaron sobre papel de filtro Whatman, contenido en placas de 14 cm de diámetro, y se incubó a -70 °C durante 15 min. El papel de filtro se embebió con el sustrato X-GAL 0,075 % (USB) y se incubó a 30 °C durante toda la noche. Una colonia positiva para una interacción se observa como una huella de coloración azul sobre el papel de filtro.

14.3.2. Crecimiento en ausencia de histidina por inducción del gen *HIS3*

El gen reportero *HIS3* codifica para la enzima imidazol glicerol fosfato deshidrogenasa, involucrada en la biosíntesis de histidina (H). La expresión de esta enzima le confiere a las levaduras la capacidad de crecer en un medio carente de dicho aminoácido. Para el ensayo, se reestriaron las colonias positivas del rastreo por activación del gen *lacZ* a placas de petri con medio SC-agar (LWH) y se incubó durante 3 días a 30 °C. Se evaluó la aparición de colonias.

15. Alineamiento múltiple de secuencias que contienen un CBD

Se utilizó el *software* DNASTAR, empleando parámetros de alineamiento por defecto.

16. Ensayo de invasión celular de epimastigotes transgénicos

Se estimularon cultivos de 1×10^6 epimastigotes transgénicos (pTEX vacío o pTEX-TcCLB.508523.80), cepa Y, durante 5 días con 8-Br-AMPc 1 mM o DMSO (control). Por otro lado, se cultivaron 30.000 células NRK/laminilla en laminillas de 12 mm, contenidas en pocillos de placas de 24 pocillos. Finalizada la estimulación con 8-Br-AMPc, se incubaron las células con los parásitos durante 5 horas y luego, se lavaron 5 veces con PBS pH 7,4 1X para retirar el exceso de parásitos. A continuación, los cultivos se fijaron con 300 μ l de paraformaldehído 4 % y se lavaron con PBS pH 7,4 1X. Se tiñeron los núcleos con 3 μ l de DAPI 1 μ g/ml y se lavó 2 veces con PBS pH 7,4 1X. Finalmente, las laminillas se montaron sobre portaobjetos, que contenían 5 μ l de solución de montaje FluorSave™ y se sellaron con esmalte. Los preparados se analizaron con el microscopio Nikon Eclipse E600 acoplado a la cámara SPOT RT™ (Diagnostic instrument). A partir de las imágenes tomadas, se contaron 3.000 células de cada tratamiento con el *software* ImageJ, complemento: contador de

células. Se calculó el porcentaje de células infectadas y para cada tratamiento se sustrajo el porcentaje de infección basal (pTEX vacío, DMSO). Los resultados se expresaron como la media de 3 experimentos independientes \pm SEM. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Anova de una vía, y para los contrastes *a posteriori*, un *test* de Tukey de comparaciones múltiples. Se empleó el *software* GraphPad Prism versión 5.03. Se definió la significancia estadística como $p < 0,05$.

17. Lisado de parásitos

Se cosecharon parásitos por centrifugación a 2.000 rpm durante 10 min y se lavaron con PBS pH 7,4 1X. Se repitió la centrifugación y se descartó el sobrenadante. Para la lisis, los parásitos se sometieron a 5 ciclos sucesivos de congelado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongelado.

Anexo

Oligonucleótidos (*primers*)

Se detalla el nombre, la secuencia y la temperatura de *melting* de cada *primer* (Tabla 9).

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm (°C)
Tc.p14 Fw	ATGCCGGATGAACGCATTCTTTTAGTC	58,2
Tc.p14 Rv	GCTCTTCTCCTCAGTGAAGTCCAAATTCAC	61,5
Tc.Sf3b155 Fw	ATGACGGACGAAGAAGAAGCGGC	59,1
Tc.Sf3b155 ¹⁻²⁷⁰ Rv	GGGATTCACATTGTGGTACTTAAGAAGC	58,5
Tc.CpsF30 Fw	ATGTTACACCGATTCCGCCGCG	58,3
Tc.CpsF30 Rv	TGCACGTCTGTGAGTGTGCCATTG	59,1
Tc.FIP1 Fw	ATGGCGGATAGTGAGGAGCCC	58,3
Tc.FIP1 Rv	GTACGACGCATCGTAGACCTGC	58,6
Tc.SF1 Fw	ATGGAGGCGAAACCGAGGC	55,4
Tc.SF1 Rv	GAGTTCATCCAAGAATGCCTGC	54,8
Tc.Y14 Fw	ATGATTATTGAAGACGCCATTGTGGACG	58,5
Tc.Y14 Rv	TCACGGACCCGCTTCTCGC	57,6
Tc.Mago Fw	ATGACGACTGAGGTGCCATGCG	59,0
Tc.Mago Rv	GCAGGCCTTGATTTTGAATGAAGCG	58,0
Tc.U2AF65 ⁶¹⁴⁻⁸⁴¹ Fw	ATGACGGTGCCTATTTACCCCACTCG	61,1
Tc.U2AF65 Rv	CTCTGCCTGCAGTTCCTCTTTTTCC	59,3
Tc.P0 ²¹²⁻³²³ Fw	ATGTCCATCACCGACGACGTTGTGG	61,0
Tc.P0 Rv	GAACAGCGCCCCCATGCCAAAG	60,4
Tc.P1 α Fw	ATGTCCTCCAAACAGCAGCTTGCC	59,1
Tc.P1 α Rv	GTCAAACAGACCAAAGCCCATATCG	57,7
Tc.P1 β Fw	ATGGCCGATAAGGTTGAAGCGAACG	59,3
Tc.P1 β Rv	GTCAAACAAGCCAAAGCCCATATCGTC	59,7
Tc.P2 α Fw	ATGTCCATGAAGTACCTCGCCGC	59,8
Tc.P2 α Rv	GTCAAACAGACCAAAGCCCATGTCATC	59,7

Tc.P2β Fw	ATGAAGTACCTTGCCGCTTACGCTC	59,3
Tc.P2β Rv	GTCAAAAAGACAAATCCCATGTCATCGTCC	60,3
Luc-C Fw	TGCACTTCAGCCAGGAG	49,5
Luc-C Rv	TTTATGTTTCAGGTTTCAGG	44,6
Luc-N Fw	ACGCAAATGGGCGGTAGG	52,6
Luc-N Rv	TCATCTGCTTGACCTG	47,1
EYFP-C Fw	ATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	56,3
EYFP-C Rv	TGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGG	56,3
EYFP-N Fw	ACGGTGGGAGGTCTATATAAG	52,4
EYFP-N Rv	GACACGCTGAACTTGTGGCCG	58,3
WW12Nt Fw	CACCATGGACATTGCTGTTTCCTC	57,4
WW12Nt Rv	TCAATCATGCGAGGGTTGTATTGCCTC	59,7
WW12 (dom) Fw	CACCATGAAGAAAGAAGGCGGCG	58,8
WW12 (dom) Rv	TCACAAGGGGTCCAAATCCGT	54,4
PY297 Fw	GCGGAACACCTGTTGGAGCAG	58,3
PY297 Rv	CTACGAGGGGTACGGTGGGG	60,0
PL251 Fw	GAGTCGGAAAACCTCGCCGGGGT	60,4
PL251 Rv	TCATGGATACATAGAGCCGACACC	57,4
PY154 Fw	CGTTGCAGTCGCCTAACGTCTTC	58,8
PY154 Rv	TCACTAAAAAAGGGGTACGGCGGCG	61,1
pDEST32 Fw	AACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTG	58,8
pDEST32 Rv	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC	57,1
Tc.CBD8523 Fw	ATGTACGGGACCTTTTTTAAAGGGTGGC	59,9
Tc.CBD8523 Rv	TTAGGATTTGGCGGCACTGCGGC	60,6
Tc.0691 Fw	ATGAGCACAATTTTCGGTGGCATCTGAAG	59,9
Tc.0691 Rv	TCAGGAAAAAAGAATCAAATTC AATAGAGAACGGGC	61,0
Tc.CBD7993 Fw	GAGGCTAATGATGCGATGACAGAAGAGC	61,4
Tc.CBD7993 Rv	TCATCCACTCCGTACACGCTGCTCCTC	64,3

Tc.8523 Fw	CACCATGTACGGGACCTTTTTTAAAGGG	59,9
Tc.8523 Rv	TCAAATTGCATCACCTTTACATGGCATTTC	60,5
Tc.8523 + EcoRI Fw	CGGAATTCATGTACGGGACCTTTTTTAAAGG	60,4
Tc.8523 + HindIII Rv	CCAAGCTTAATTGCATCACCTTTACATGGC	61,7
Tc.8523R91K Fw	CTTGGTGTGTAAGGAGCCTAAGAGTGCATCCATTCA ATGT	66,5
Tc.8523R91K Rv	ACATTGAATGGATGCACTCTTAGGCTCCTTACACACC AAG	66,5
M13 (-20) Fw	GTAAAACGACGGCCAG	45,9
M13 Rv	GTCATAGCTGTTTCCTG	44,6
T7 promotor	TAATACGACTACCTATAGGG	47,7

Tabla 9. Lista de *primers*. Fw: *forward*; Rv: *reverse*; T°m: temperatura de *melting*.

Referencias

(1999). "Recommendations from a satellite meeting." Mem Inst Oswaldo Cruz **94** (Suppl 1): 429-432.

Andrews, N. W. (1995). "Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." Trends Cell Biol **5**(3): 133-137.

Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, y col. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3684-3689.

Aqeilan, R. I., M. Q. Hassan, A. de Bruin, y col. (2008). "The WWOX tumor suppressor is essential for postnatal survival and normal bone metabolism." J Biol Chem **283**(31): 21629-21639.

Audet, N. and G. Pineyro (2011). "Using BRET to detect ligand-specific conformational changes in preformed signalling complexes." Methods Mol Biol **756**: 149-163.

Avila, M. L., N. Bercovich, G. Westergaard, y col. (2007). "Mapping of the protein-binding interface between splicing factors SF3b155 and p14 of *Trypanosoma cruzi*." Biochem Biophys Res Commun **364**(1): 26-32.

Ayoub, M. A., A. Levoye, P. Delagrangue, y col. (2004). "Preferential formation of MT1/MT2 melatonin receptor heterodimers with distinct ligand interaction properties compared with MT2 homodimers." Mol Pharmacol **66**(2): 312-321.

Bacart, J., C. Corbel, R. Jockers, y col. (2008). "The BRET technology and its application to screening assays." Biotechnol J **3**(3): 311-324.

Bao, Y., L. M. Weiss, V. L. Braunstein, y col. (2008). "Role of protein kinase A in *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **76**(10): 4757-4763.

Bao, Y., L. M. Weiss, M. Hashimoto, y col. (2009). "Protein kinase A regulatory subunit interacts with P-Type ATPases in *Trypanosoma cruzi*." Am J Trop Med Hyg **80**(6): 941-943.

Beavo, J. A. (1995). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms." Physiol Rev **75**(4): 725-748.

Bedford, M. T., R. Reed and P. Leder (1998). "WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(18): 10602-10607.

Bednarek, A. K., K. J. Laflin, R. L. Daniel, y col. (2000). "WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer." Cancer Res **60**(8): 2140-2145.

- Bee, A., F. J. Culley, I. S. Alkhalife, y col. (2001). "Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human C-reactive protein." Parasitology **122**(Pt 5): 521-529.
- Benoff, B., H. Yang, C. L. Lawson, y col. (2002). "Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha CTD-DNA complex." Science **297**(5586): 1562-1566.
- Bercovich, N., M. J. Levin, C. Clayton, y col. (2009). "Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **166**(2): 190-193.
- Bercovich, N., M. J. Levin and M. P. Vazquez (2009). "The FIP-1 like polyadenylation factor in trypanosomes and the structural basis for its interaction with CPSF30." Biochem Biophys Res Commun **380**(4): 850-855.
- Berman, H. M., L. F. Ten Eyck, D. S. Goodsell, y col. (2005). "The cAMP binding domain: an ancient signaling module." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 45-50.
- Blanpain, C., W. E. Lowry, H. A. Pasolli, y col. (2006). "Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage." Genes Dev **20**(21): 3022-3035.
- Blanquart, C., C. Gonzalez-Yanes and T. Issad (2006). "Monitoring the activation state of insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors using bioluminescence resonance energy transfer." Mol Pharmacol **70**(5): 1802-1811.
- Bonifacio, J. M. (2005). Nardophyllum cabreræ (Asteraceae: Astereae), a new species from Argentina and new taxonomic changes involving Nardophyllum Hook. et Arn, Taxon.
- Bork, P. and M. Sudol (1994). "The WW domain: a signalling site in dystrophin?" Trends Biochem Sci **19**(12): 531-533.
- Bourdy, G., P. Oporto, A. Gimenez, y col. (2004). "A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceno-Guarani Indians." J Ethnopharmacol **93**(2-3): 269-277.
- Boute, N., R. Jockers and T. Issad (2002). "The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET." Trends Pharmacol Sci **23**(8): 351-354.
- Boute, N., K. Pernet and T. Issad (2001). "Monitoring the activation state of the insulin receptor using bioluminescence resonance energy transfer." Mol Pharmacol **60**(4): 640-645.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brener, Z. (1973). "Biology of *Trypanosoma cruzi*." Annu Rev Microbiol **27**: 347-382.

Brener, Z. and R. T. Gazzinelli (1997). "Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease." Int Arch Allergy Immunol **114**(2): 103-110.

Briones, M. R., R. P. Souto, B. S. Stolf, y col. (1999). "The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity." Mol Biochem Parasitol **104**(2): 219-232.

Brisse, S., J. C. Dujardin and M. Tibayrenc (2000). "Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers." Mol Biochem Parasitol **111**(1): 95-105.

Brock, M., F. Fan, F. C. Mei, y col. (2007). "Conformational analysis of Epac activation using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry." J Biol Chem **282**(44): 32256-32263.

Brosi, R., H. P. Hauri and A. Kramer (1993). "Separation of splicing factor SF3 into two components and purification of SF3a activity." J Biol Chem **268**(23): 17640-17646.

Campbell, D. A., N. R. Sturm and M. C. Yu (2000). "Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene." Parasitol Today **16**(2): 78-82.

Caro, F., N. Bercovich, C. Atorrasagasti, y col. (2005). "Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of *Trypanosoma cruzi*: implications for their functions." Biochem Biophys Res Commun **333**(3): 1017-1025.

Clayton, C. E. (2002). "Life without transcriptional control? From fly to man and back again." EMBO J **21**(8): 1881-1888.

Clegg, R. M., A. I. Murchie, A. Zechel, y col. (1993). "Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2994-2998.

Cochran, J. N., P. V. Diggs, N. M. Nebane, y col. (2014). "AlphaScreen HTS and live-cell bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays for identification of Tau-Fyn SH3 interaction inhibitors for Alzheimer disease." J Biomol Screen **19**(10): 1338-1349.

Committee, W. H. O. E. (2002). "Control of Chagas disease. World Health Organization Technical Report Series." **905**, i-vi: 1-109.

Concepcion, J. L., D. Gonzalez-Pacanowska and J. A. Urbina (1998). "3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: subcellular localization and kinetic properties." Arch Biochem Biophys **352**(1): 114-120.

Conti, M. and S. L. Jin (1999). "The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **63**: 1-38.

- Corbel, C., Q. Wang, H. Bousserouel, y col. (2011). "First BRET-based screening assay performed in budding yeast leads to the discovery of CDK5/p25 interaction inhibitors." Biotechnol J **6**(7): 860-870.
- Correa, E., D. Cardona, W. Quinones, y col. (2006). "Leishmanicidal activity of *Pycnoporus sanguineus*." Phytother Res **20**(6): 497-499.
- Coura, J. R. and J. C. Dias (2009). "Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery." Mem Inst Oswaldo Cruz **104** **Suppl 1**: 31-40.
- Couturier, C. and B. Deprez (2012). "Setting Up a Bioluminescence Resonance Energy Transfer High throughput Screening Assay to Search for Protein/Protein Interaction Inhibitors in Mammalian Cells." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 100.
- Couturier, C. and R. Jockers (2003). "Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers." J Biol Chem **278**(29): 26604-26611.
- Chatelain, E. and J. R. Ioset (2011). "Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model." Drug Des Devel Ther **5**: 175-181.
- Chen, H. I., A. Einbond, S. J. Kwak, y col. (1997). "Characterization of the WW domain of human yes-associated protein and its polyproline-containing ligands." J Biol Chem **272**(27): 17070-17077.
- Cheng, X., Z. Ji, T. Tsalkova, y col. (2008). "Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(7): 651-662.
- da Silva Filho, A. A., D. O. Resende, M. J. Fukui, y col. (2009). "In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae)." Fitoterapia **80**(8): 478-482.
- de Koning, H. P., M. K. Gould, G. J. Sterk, y col. (2012). "Pharmacological validation of *Trypanosoma brucei* phosphodiesterases as novel drug targets." J Infect Dis **206**(2): 229-237.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, y col. (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature **396**(6710): 474-477.
- de Souza, W. (1984). "Cell biology of *Trypanosoma cruzi*." Int Rev Cytol **86**: 197-283.
- Diller, T. C., Madhusudan, N. H. Xuong, y col. (2001). "Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit." Structure **9**(1): 73-82.

- Dodge, K. L., S. Khouangsathiene, M. S. Kapiloff, y col. (2001). "mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module." EMBO J **20**(8): 1921-1930.
- Donelson, J. E., M. J. Gardner and N. M. El-Sayed (1999). "More surprises from Kinetoplastida." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2579-2581.
- Dremier, S., R. Kopperud, S. O. Doskeland, y col. (2003). "Search for new cyclic AMP-binding proteins." FEBS Lett **546**(1): 103-107.
- Duncan, R., R. Alvarez, C. L. Jaffe, y col. (2001). "Early response gene expression during differentiation of cultured *Leishmania donovani*." Parasitol Res **87**(11): 897-906.
- Ebright, R. H., S. F. Le Grice, J. P. Miller, y col. (1985). "Analogues of cyclic AMP that elicit the biochemically defined conformational change in catabolite gene activator protein (CAP) but do not stimulate binding to DNA." J Mol Biol **182**(1): 91-107.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, y col. (2005). "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease." Science **309**(5733): 409-415.
- Epting, C. L., B. M. Coates and D. M. Engman (2010). "Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **126**(3): 283-291.
- Feher, M. and J. M. Schmidt (2003). "Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry." J Chem Inf Comput Sci **43**(1): 218-227.
- Fernandes, A. B., I. Neira, A. T. Ferreira, y col. (2006). "Cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways." Parasitol Res **100**(1): 59-68.
- Fischer, G., M. Rossmann and M. Hyvonen (2015). "Alternative modulation of protein-protein interactions by small molecules." Curr Opin Biotechnol **35**: 78-85.
- Fraidenraich, D., C. Pena, E. L. Isola, y col. (1993). "Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma hindgut*: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10140-10144.
- Freilij H B. M., L. A., Ballerign G, Moscateli G, Altcheh J (2007). Enfermedad de Chagas en la edad pediátrica. La enfermedad de Chagas, a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral: 65-75.
- Gales, C., J. J. Van Durm, S. Schaak, y col. (2006). "Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes." Nat Struct Mol Biol **13**(9): 778-786.

- Garcia-Bournissen, F., S. Moroni, M. E. Marson, y col. (2015). "Limited infant exposure to benznidazole through breast milk during maternal treatment for Chagas disease." Arch Dis Child **100**(1): 90-94.
- Gehret, A. U., A. Bajaj, F. Naider, y col. (2006). "Oligomerization of the yeast alpha-factor receptor: implications for dominant negative effects of mutant receptors." J Biol Chem **281**(30): 20698-20714.
- Giordanetto, F., A. Schafer and C. Ottmann (2014). "Stabilization of protein-protein interactions by small molecules." Drug Discov Today **19**(11): 1812-1821.
- Goad, L. J., G. G. Holz, Jr. and D. H. Beach (1984). "Sterols of Leishmania species. Implications for biosynthesis." Mol Biochem Parasitol **10**(2): 161-170.
- Gomez Barroso, J. A., H. Pereira, M. Miranda, y col. (2010). "Protein preparation, crystallization and preliminary X-ray analysis of Trypanosoma cruzi nucleoside diphosphate kinase 1." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **66**(Pt 7): 862-865.
- Gonzales-Perdomo, M., P. Romero and S. Goldenberg (1988). "Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate Trypanosoma cruzi differentiation." Exp Parasitol **66**(2): 205-212.
- Gould, M. K., S. Bachmaier, J. A. Ali, y col. (2013). "Cyclic AMP effectors in African trypanosomes revealed by genome-scale RNA interference library screening for resistance to the phosphodiesterase inhibitor CpdA." Antimicrob Agents Chemother **57**(10): 4882-4893.
- Gurtler, R. E., U. Kitron, M. C. Cecere, y col. (2007). "Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16194-16199.
- Hall, B. S., C. Bot and S. R. Wilkinson (2011). "Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites." J Biol Chem **286**(15): 13088-13095.
- Hall, B. S. and S. R. Wilkinson (2012). "Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation." Antimicrob Agents Chemother **56**(1): 115-123.
- Haugland, R. P., J. Yguerabide and L. Stryer (1969). "Dependence of the kinetics of singlet-singlet energy transfer on spectral overlap." Proc Natl Acad Sci U S A **63**(1): 23-30.
- Heath, S., S. Hieny and A. Sher (1990). "A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of Trypanosoma cruzi." Mol Biochem Parasitol **43**(1): 133-141.
- Hendriks, E. F., D. R. Robinson, M. Hinkins, y col. (2001). "A novel CCCH protein which modulates differentiation of Trypanosoma brucei to its procyclic form." EMBO J **20**(23): 6700-6711.

- Hesselberth, J. R., J. P. Miller, A. Golob, y col. (2006). "Comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* WW domains and their interacting proteins." Genome Biol **7**(4): R30.
- Holz, G. G., O. G. Chepurny and F. Schwede (2008). "Epac-selective cAMP analogs: new tools with which to evaluate the signal transduction properties of cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors." Cell Signal **20**(1): 10-20.
- Hu, H., J. Columbus, Y. Zhang, y col. (2004). "A map of WW domain family interactions." Proteomics **4**(3): 643-655.
- Huang, H., L. M. Weiss, F. Nagajyothi, y col. (2006). "Molecular cloning and characterization of the protein kinase A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **149**(2): 242-245.
- Huang, H., C. Werner, L. M. Weiss, y col. (2002). "Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi*." Int J Parasitol **32**(9): 1107-1115.
- Ibragimova, G. T. and R. C. Wade (1999). "Stability of the beta-sheet of the WW domain: A molecular dynamics simulation study." Biophys J **77**(4): 2191-2198.
- Illesley, J. L., M. Sudol and S. J. Winder (2001). "The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation." Cell Signal **13**(9): 625-632.
- Ingham, R. J., K. Colwill, C. Howard, y col. (2005). "WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks." Mol Cell Biol **25**(16): 7092-7106.
- Ingham, R. J., G. Gish and T. Pawson (2004). "The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture." Oncogene **23**(11): 1972-1984.
- Jager, A. V., J. G. De Gaudenzi, J. G. Mild, y col. (2014). "Identification of novel cyclic nucleotide binding proteins in *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **198**(2): 104-112.
- Jager, M., H. Nguyen, J. C. Crane, y col. (2001). "The folding mechanism of a beta-sheet: the WW domain." J Mol Biol **311**(2): 373-393.
- Jager, M., H. Nguyen, M. Dendle, y col. (2007). "Influence of hPin1 WW N-terminal domain boundaries on function, protein stability, and folding." Protein Sci **16**(7): 1495-1501.
- Johner, A., S. Kunz, M. Linder, y col. (2006). "Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of *Leishmania major*." BMC Microbiol **6**: 25.
- Juri Ayub, M., C. R. Smulski, B. Nyambega, y col. (2005). "Protein-protein interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex." Gene **357**(2): 129-136.

Kannan, N., J. Wu, G. S. Anand, y col. (2007). "Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module." Genome Biol **8**(12): R264.

Kasprzak, A. A. (2007). "The use of FRET in the analysis of motor protein structure." Methods Mol Biol **392**: 183-197.

Kato, Y., M. Ito, K. Kawai, y col. (2002). "Determinants of ligand specificity in groups I and IV WW domains as studied by surface plasmon resonance and model building." J Biol Chem **277**(12): 10173-10177.

Kato, Y., K. Nagata, M. Takahashi, y col. (2004). "Common mechanism of ligand recognition by group II/III WW domains: redefining their functional classification." J Biol Chem **279**(30): 31833-31841.

Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, y col. (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." Science **282**(5397): 2275-2279.

Kay, B. K., M. P. Williamson and M. Sudol (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." FASEB J **14**(2): 231-241.

Kedersha, N. L. and L. H. Rome (1986). "Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA." J Cell Biol **103**(3): 699-709.

Keller, R. C., J. R. Silvius and B. De Kruijff (1995). "Characterization of the resonance energy transfer couple coumarin-BODIPY and its possible applications in protein-lipid research." Biochem Biophys Res Commun **207**(2): 508-514.

Kino, T., H. Hatanaka, S. Miyata, y col. (1987). "FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro." J Antibiot (Tokyo) **40**(9): 1256-1265.

Kolli, S., C. I. Zito, M. H. Mossink, y col. (2004). "The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling." J Biol Chem **279**(28): 29374-29385.

Kuno, T., H. Shuntoh, M. Sakaue, y col. (1988). "Site-directed mutagenesis of the cAMP-binding sites of the recombinant type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase." Biochem Biophys Res Commun **153**(3): 1244-1250.

Kunz, S., J. A. Beavo, M. A. D'Angelo, y col. (2006). "Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of the kinetoplastida: a unified nomenclature." Mol Biochem Parasitol **145**(1): 133-135.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lascu, I. and P. Gonin (2000). "The catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinases." J Bioenerg Biomembr **32**(3): 237-246.

Laukens, K., L. Roef, E. Witters, y col. (2001). "Cyclic AMP affinity purification and ESI-QTOF MS-MS identification of cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and two nucleoside diphosphate kinase isoforms from tobacco BY-2 cells." FEBS Lett **508**(1): 75-79.

Laxman, S., A. Riechers, M. Sadilek, y col. (2006). "Hydrolysis products of cAMP analogs cause transformation of *Trypanosoma brucei* from slender to stumpy-like forms." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19194-19199.

Lee, M. L. and G. Schneider (2001). "Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: application in the design of natural product-based combinatorial libraries." J Comb Chem **3**(3): 284-289.

Levin, M. J. (1996). "In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite." Parasitol Today **12**(11): 415-416.

Levine, N. D., J. O. Corliss, F. E. Cox, y col. (1980). "A newly revised classification of the protozoa." J Protozool **27**(1): 37-58.

Liang, X. H., A. Haritan, S. Uliel, y col. (2003). "trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation." Eukaryot Cell **2**(5): 830-840.

Liljas, A. (1991). "Comparative biochemistry and biophysics of ribosomal proteins." Int Rev Cytol **124**: 103-136.

Linn, H., K. S. Ermekova, S. Rentschler, y col. (1997). "Using molecular repertoires to identify high-affinity peptide ligands of the WW domain of human and mouse YAP." Biol Chem **378**(6): 531-537.

Lu, P. J., X. Z. Zhou, M. Shen, y col. (1999). "Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules." Science **283**(5406): 1325-1328.

Lukes, J., H. Hashimi and A. Zikova (2005). "Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates." Curr Genet **48**(5): 277-299.

Macias, M. J., M. Hyvonen, E. Baraldi, y col. (1996). "Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide." Nature **382**(6592): 646-649.

Macias, M. J., S. Wiesner and M. Sudol (2002). "WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands." FEBS Lett **513**(1): 30-37.

- Maguire, S. L., A. Leonidou, P. Wai, y col. (2015). "SF3B1 mutations constitute a novel therapeutic target in breast cancer." J Pathol **235**(4): 571-580.
- Mair, G., H. Shi, H. Li, y col. (2000). "A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA." RNA **6**(2): 163-169.
- Maldonado, E., M. Soriano-Garcia, A. Moreno, y col. (1998). "Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes." J Mol Biol **283**(1): 193-203.
- Manning-Cela, R., A. Gonzalez and J. Swindle (2002). "Alternative splicing of LYT1 transcripts in *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **70**(8): 4726-4728.
- Martinez-Diaz, R. A., J. A. Escario, J. J. Nogal-Ruiz, y col. (2001). "Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains." Mem Inst Oswaldo Cruz **96**(1): 53-59.
- Matthews, K. R., C. Tschudi and E. Ullu (1994). "A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes." Genes Dev **8**(4): 491-501.
- Mazars, A. and R. Fahraeus (2010). "Using BRET to study chemical compound-induced disruptions of the p53-HDM2 interactions in live cells." Biotechnol J **5**(4): 377-384.
- Mc Cormack, B. (2014). Tesis de Licenciatura. Identificación y caracterización de proteínas con dominios de unión a AMPc en *T. cruzi*, Universidad de Buenos Aires.
- McKay, D. B. and T. A. Steitz (1981). "Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA." Nature **290**(5809): 744-749.
- McKay, D. B., I. T. Weber and T. A. Steitz (1982). "Structure of catabolite gene activator protein at 2.9-Å resolution. Incorporation of amino acid sequence and interactions with cyclic AMP." J Biol Chem **257**(16): 9518-9524.
- McNicholl, E. T., R. Das, S. SilDas, y col. (2010). "Communication between tandem cAMP binding domains in the regulatory subunit of protein kinase A- α as revealed by domain-silencing mutations." J Biol Chem **285**(20): 15523-15537.
- Melino, G., E. Gallagher, R. I. Aqeilan, y col. (2008). "Itch: a HECT-type E3 ligase regulating immunity, skin and cancer." Cell Death Differ **15**(7): 1103-1112.
- Mercier, J. F., A. Salahpour, S. Angers, y col. (2002). "Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer." J Biol Chem **277**(47): 44925-44931.

Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman, y col. (2006). "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1463-1477.

Ministerio de Salud de la Nación, S. d. P., Regulación e Institutos (2012). Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Programa Nacional de Chagas.

Minning, T. A., D. B. Weatherly, J. Atwood, 3rd, y col. (2009). "The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*." BMC Genomics **10**: 370.

Miranda, M. R., G. E. Canepa, L. A. Bouvier, y col. (2008). "*Trypanosoma cruzi*: multiple nucleoside diphosphate kinase isoforms in a single cell." Exp Parasitol **120**(1): 103-107.

Morking, P. A., B. M. Dallagiovanna, L. Foti, y col. (2004). "TcZFP1: a CCCH zinc finger protein of *Trypanosoma cruzi* that binds poly-C oligoribonucleotides in vitro." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 169-177.

Murphy, W. J., K. P. Watkins and N. Agabian (1986). "Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing." Cell **47**(4): 517-525.

Murta, S. M., R. T. Gazzinelli, Z. Brener, y col. (1998). "Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzimidazole and nifurtimox." Mol Biochem Parasitol **93**(2): 203-214.

Myers, P. L. (1997). "Will combinatorial chemistry deliver real medicines?" Curr Opin Biotechnol **8**(6): 701-707.

Naula, C. and T. Seebeck (2000). "Cyclic AMP signaling in trypanosomatids." Parasitol Today **16**(1): 35-38.

Neira, I., A. T. Ferreira and N. Yoshida (2002). "Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells." Int J Parasitol **32**(4): 405-414.

Newman, D. J. and G. M. Cragg (2012). "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010." J Nat Prod **75**(3): 311-335.

Nieto, C., T. Pellicer, D. Balsa, y col. (2006). "The chromosomal relBE2 toxin-antitoxin locus of *Streptococcus pneumoniae*: characterization and use of a bioluminescence resonance energy transfer assay to detect toxin-antitoxin interaction." Mol Microbiol **59**(4): 1280-1296.

Nooren, I. M. and J. M. Thornton (2003). "Diversity of protein-protein interactions." EMBO J **22**(14): 3486-3492.

Nwaka, S. and A. Hudson (2006). "Innovative lead discovery strategies for tropical diseases." Nat Rev Drug Discov **5**(11): 941-955.

Ochatt, C. M., R. M. Ulloa, H. N. Torres, y col. (1993). "Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase." Mol Biochem Parasitol **57**(1): 73-81.

Olivares-Illana, V., A. Rodriguez-Romero, I. Becker, y col. (2007). "Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*." PLoS Negl Trop Dis **1**(1): e1.

Oliveira, M. M., E. D. Rocha, E. Rondinelli, y col. (1993). "Signal transduction in *Trypanosoma cruzi*: opposite effects of adenylcyclase and phospholipase C systems in growth control." Mol Cell Biochem **124**(2): 91-99.

Otte, L., U. Wiedemann, B. Schlegel, y col. (2003). "WW domain sequence activity relationships identified using ligand recognition propensities of 42 WW domains." Protein Sci **12**(3): 491-500.

Ouaissi, A., J. Cornette, R. Schoneck, y col. (1992). "Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes." Eur J Cell Biol **59**(1): 68-79.

PAHO/WHO (2014). "Small Bites Big threats " <http://www.PAHO.org>.

Paterou, A., P. Walrad, P. Craddy, y col. (2006). "Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCCH protein that promotes trypanosome life-cycle development." J Biol Chem **281**(51): 39002-39013.

Pena-Diaz, J., A. Montalvetti, A. Camacho, y col. (1997). "A soluble 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **324 (Pt 2)**: 619-626.

Peng, T., J. S. Zintsmaster, A. T. Namanja, y col. (2007). "Sequence-specific dynamics modulate recognition specificity in WW domains." Nat Struct Mol Biol **14**(4): 325-331.

Pereira, C. A., L. A. Bouvier, L. Camara Mde, y col. (2011). "Singular features of trypanosomatids' phosphotransferases involved in cell energy management." Enzyme Res **2011**: 576483.

Pfleger, K. D. and K. A. Eidne (2006). "Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Nat Methods **3**(3): 165-174.

Pollard, V. W., S. P. Rohrer, E. F. Michelotti, y col. (1990). "Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*." Cell **63**(4): 783-790.

- Popovych, N., S. R. Tzeng, M. Tonelli, y col. (2009). "Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 6927-6932.
- Rall, T. W. and E. W. Sutherland (1958). "Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles." J Biol Chem **232**(2): 1065-1076.
- Ramsay, D., I. C. Carr, J. Pediani, y col. (2004). "High-affinity interactions between human alpha1A-adrenoceptor C-terminal splice variants produce homo- and heterodimers but do not generate the alpha1L-adrenoceptor." Mol Pharmacol **66**(2): 228-239.
- Ranganathan, R., K. P. Lu, T. Hunter, y col. (1997). "Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent." Cell **89**(6): 875-886.
- Rangel-Aldao, R., O. Allende, F. Triana, y col. (1987). "Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*." Mol Biochem Parasitol **22**(1): 39-43.
- Rangel-Aldao, R., F. Triana, V. Fernandez, y col. (1988). "Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*." Biochem Int **17**(2): 337-344.
- Rassi, A., Jr., A. Rassi and J. A. Marin-Neto (2010). "Chagas disease." Lancet **375**(9723): 1388-1402.
- Reinert, M. (2011). Tesis de Licenciatura. Identificación y caracterización de proteínas con dominios WW en *Trypanosoma cruzi*, como potenciales blancos para el diseño de drogas antiparasitarias. Tesis de Licenciatura, Universidad de Buenos Aires.
- Rentschler, S., H. Linn, K. Deininger, y col. (1999). "The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan." Biol Chem **380**(4): 431-442.
- Rodriguez, A., I. Martinez, A. Chung, y col. (1999). "cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes." J Biol Chem **274**(24): 16754-16759.
- Rodrigues Coura, J. and S. L. de Castro (2002). "A critical review on Chagas disease chemotherapy." Mem Inst Oswaldo Cruz **97**(1): 3-24.
- Rohloff, P. and R. Docampo (2008). "A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **118**(1): 17-24.
- Rolin, S., J. Hanocq-Quertier, F. Paturiaux-Hanocq, y col. (1996). "Simultaneous but independent activation of adenylate cyclase and glycosylphosphatidylinositol-phospholipase C under stress conditions in *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem **271**(18): 10844-10852.

Rossi, M., R. I. Aqeilan, M. Neale, y col. (2006). "The E3 ubiquitin ligase Itch controls the protein stability of p63." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12753-12758.

Rymond, B. (2007). "Targeting the spliceosome." Nat Chem Biol **3**(9): 533-535.

Salah, Z., A. Alian and R. I. Aqeilan (2012). "WW domain-containing proteins: retrospectives and the future." Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 331-348.

Salah, Z., R. Aqeilan and K. Huebner (2010). "WWOX gene and gene product: tumor suppression through specific protein interactions." Future Oncol **6**(2): 249-259.

Salem, M. M. and K. A. Werbovetz (2006). "Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis." Curr Med Chem **13**(21): 2571-2598.

Salud, O. M. d. I. (2015). "La Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.

Sanchez, M., M. Mazzuca, M. J. Veloso, y col. (2010). "Cytotoxic terpenoids from *Nardophyllum bryoides*." Phytochemistry **71**(11-12): 1395-1399.

Santos, D. O. and M. M. Oliveira (1988). "Effect of cAMP on macromolecule synthesis in the pathogenic protozoa *Trypanosoma cruzi*." Mem Inst Oswaldo Cruz **83**(3): 287-292.

Scholten, A., M. K. Poh, T. A. van Veen, y col. (2006). "Analysis of the cGMP/cAMP interactome using a chemical proteomics approach in mammalian heart tissue validates sphingosine kinase type 1-interacting protein as a genuine and highly abundant AKAP." J Proteome Res **5**(6): 1435-1447.

Sehgal, S. N., H. Baker and C. Vezina (1975). "Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization." J Antibiot (Tokyo) **28**(10): 727-732.

Selenko, P., G. Gregorovic, R. Sprangers, y col. (2003). "Structural basis for the molecular recognition between human splicing factors U2AF65 and SF1/mBBP." Mol Cell **11**(4): 965-976.

Shabb, J. B. (2001). "Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase." Chem Rev **101**(8): 2381-2411.

Shabb, J. B., B. D. Buzzeo, L. Ng, y col. (1991). "Mutating protein kinase cAMP-binding sites into cGMP-binding sites. Mechanism of cGMP selectivity." J Biol Chem **266**(36): 24320-24326.

Shabb, J. B. and J. D. Corbin (1992). "Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions." J Biol Chem **267**(9): 5723-5726.

- Shalaby, T., M. Liniger and T. Seebeck (2001). "The regulatory subunit of a cGMP-regulated protein kinase A of *Trypanosoma brucei*." Eur J Biochem **268**(23): 6197-6206.
- Shapiro, T. A. and P. T. Englund (1995). "The structure and replication of kinetoplast DNA." Annu Rev Microbiol **49**: 117-143.
- Siless, G. E., E. Lozano, M. Sanchez, y col. (2013). "Preparation and antitrypanosomal activity of secochiliolide acid derivatives." Bioorg Med Chem Lett **23**(17): 4964-4967.
- Simpson, L. (1987). "The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution." Annu Rev Microbiol **41**: 363-382.
- Simpson, L., R. Aphasizhev, G. Gao, y col. (2004). "Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing." RNA **10**(2): 159-170.
- Smulski, C. R., S. A. Longhi, M. J. Ayub, y col. (2011). "Interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex (stalk) and the elongation factor 2." J Mol Recognit **24**(2): 359-370.
- Su, Y., W. R. Dostmann, F. W. Herberg, y col. (1995). "Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains." Science **269**(5225): 807-813.
- Subramanian, C., Y. Xu, C. H. Johnson, y col. (2004). "In vivo detection of protein-protein interaction in plant cells using BRET." Methods Mol Biol **284**: 271-286.
- Sudol, M. (1996). "Structure and function of the WW domain." Prog Biophys Mol Biol **65**(1-2): 113-132.
- Sudol, M. and T. Hunter (2000). "NeW wrinkles for an old domain." Cell **103**(7): 1001-1004.
- Sutherland, E. W. (1972). "Studies on the mechanism of hormone action." Science **177**(4047): 401-408.
- Sutherland, E. W. and T. W. Rall (1958). "Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles." J Biol Chem **232**(2): 1077-1091.
- Sutton, R. E. and J. C. Boothroyd (1986). "Evidence for trans splicing in trypanosomes." Cell **47**(4): 527-535.
- SV Bhat, B. B., H Dornauer, NJ do Scusa, H-W Fehlhaber (1977). "Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *coleus forskohlii* briq." Tetrahedron Letters **18**(19): 1669-1672.

- Tagoe, D. N., T. D. Kalejaiye and H. P. de Koning (2015). "The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference!" Front Pharmacol **6**: 185.
- Taketa, A. T., S. C. Gnoatto, G. Gosmann, y col. (2004). "Triterpenoids from Brazilian Ilex species and their in vitro antitrypanosomal activity." J Nat Prod **67**(10): 1697-1700.
- Tanaka, H. and T. Tsukihara (2012). "Structural studies of large nucleoprotein particles, vaults." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **88**(8): 416-433.
- Tange, T. O., A. Nott and M. J. Moore (2004). "The ever-increasing complexities of the exon junction complex." Curr Opin Cell Biol **16**(3): 279-284.
- Tellez-Valencia, A., V. Olivares-Illana, A. Hernandez-Santoyo, y col. (2004). "Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface." J Mol Biol **341**(5): 1355-1365.
- Thiel, P., M. Kaiser and C. Ottmann (2012). "Small-molecule stabilization of protein-protein interactions: an underestimated concept in drug discovery?" Angew Chem Int Ed Engl **51**(9): 2012-2018.
- Ulloa, R. M., E. Mesri, M. Esteva, y col. (1988). "Cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi*." Biochem J **255**(1): 319-326.
- Urbina, J. A., K. Lazardi, T. Aguirre, y col. (1991). "Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195,739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*." Antimicrob Agents Chemother **35**(4): 730-735.
- Vanhamme, L. and E. Pays (1995). "Control of gene expression in trypanosomes." Microbiol Rev **59**(2): 223-240.
- Vassella, E., B. Reuner, B. Yutzy, y col. (1997). "Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway." J Cell Sci **110** (Pt 21): 2661-2671.
- Vazquez, M. P., D. Mualem, N. Bercovich, y col. (2009). "Functional characterization and protein-protein interactions of trypanosome splicing factors U2AF35, U2AF65 and SF1." Mol Biochem Parasitol **164**(2): 137-146.
- Vazquez, M. P., A. G. Schijman, A. Panebra, y col. (1992). "Nucleotide sequence of a cDNA encoding another *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P2 type protein (TcP2b)." Nucleic Acids Res **20**(11): 2893.
- Verdecia, M. A., M. E. Bowman, K. P. Lu, y col. (2000). "Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains." Nat Struct Biol **7**(8): 639-643.

- Wani, M. C., H. L. Taylor, M. E. Wall, y col. (1971). "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*." J Am Chem Soc **93**(9): 2325-2327.
- Webb, T. R., A. S. Joyner and P. M. Potter (2013). "The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer." Drug Discov Today **18**(1-2): 43-49.
- Weber, I. T. and T. A. Steitz (1987). "Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution." J Mol Biol **198**(2): 311-326.
- Weber, I. T., K. Takio, K. Titani, y col. (1982). "The cAMP-binding domains of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and the catabolite gene activator protein are homologous." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(24): 7679-7683.
- Wiesner, S., G. Stier, M. Sattler, y col. (2002). "Solution structure and ligand recognition of the WW domain pair of the yeast splicing factor Prp40." J Mol Biol **324**(4): 807-822.
- Woodford, T. A., L. A. Correll, G. S. McKnight, y col. (1989). "Expression and characterization of mutant forms of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. The effect of defective cAMP binding on holoenzyme activation." J Biol Chem **264**(22): 13321-13328.
- Wu, P. and L. Brand (1994). "Resonance energy transfer: methods and applications." Anal Biochem **218**(1): 1-13.
- Xu, Y., D. W. Piston and C. H. Johnson (1999). "A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 151-156.
- Yu, S., L. Avery, E. Baude, y col. (1997). "Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3384-3387.
- Yu, S., F. Fan, S. C. Flores, y col. (2006). "Dissecting the mechanism of Epac activation via hydrogen-deuterium exchange FT-IR and structural modeling." Biochemistry **45**(51): 15318-15326.
- Yu, Z., N. Fotouhi-Ardakani, L. Wu, y col. (2002). "PTEN associates with the vault particles in HeLa cells." J Biol Chem **277**(43): 40247-40252.
- Zarrinpar, A., R. P. Bhattacharyya and W. A. Lim (2003). "The structure and function of proline recognition domains." Sci STKE **2003**(179): RE8.
- Zarrinpar, A. and W. A. Lim (2000). "Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition." Nat Struct Biol **7**(8): 611-613.

Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, y col. (2009). "A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI." Mem Inst Oswaldo Cruz **104**(7): 1051-1054.