



***Evaluación de la actividad  
bioquímica y biológica anti-  
trípanosoma de una quimioteca***

Diego Charquero Bermejo

31 de Octubre de 2014

Orientador: Dr. Marcelo A. Comini – Co-orientador: Mag. Diego Benítez

Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas

Institut Pasteur de Montevideo

# RESUMEN

Los parásitos del género *Trypanosoma* son responsables de enfermedades que afectan al hombre y al ganado, siendo *T. brucei* el agente causante de la enfermedad del sueño y *nagana* respectivamente. El carácter zoonótico de estas enfermedades, que incluye diferentes especies de insectos como vectores y animales salvajes como reservorios, hacen necesaria la implementación de estrategias de control eficaces. Hasta ahora la única opción de tratamiento disponible ha sido la quimioterapia, debido a los complejos mecanismos de evasión del sistema inmune que poseen los tripanosomas. Desafortunadamente sólo hay un puñado de drogas disponibles para tratar la enfermedad del sueño, las cuales además presentan ciertas desventajas como generación de resistencia, baja eficacia, difícil administración y alta toxicidad. Por ello existe la necesidad de descubrir nuevas entidades químicas que actúen sobre componentes indispensables y específicos del metabolismo de los parásitos. El metabolismo redox dependiente de tioles de los tripanosomas difiere marcadamente del presente en mamíferos y por lo tanto ofrece blancos moleculares confiables para desarrollar fármacos selectivos. Estos parásitos emplean al tripanotión (bis-glutationil espermidina), la tripanotión reductasa y la triparredoxina para mantener su homeostasis redox. La biosíntesis de tripanotión es catalizada por el dominio C-terminal de la enzima tripanotión sintetasa (EC 6.3.1.9) a expensas de ATP. La indispensabilidad de esta enzima para la viabilidad del parásito y su inexistencia en humanos la convierte en un buen candidato como blanco de fármacos.

Los trabajos pioneros en el desarrollo de inhibidores contra la tripanotión sintetasa emplearon enzimas similares de especies de tripanosomátidos no patógenos y el núcleo estructural del glutatión como molde inicial, con resultados poco alentadores a nivel biológico. En los últimos años y mediante estrategias de cribado de quimiotecas y diseño racional de compuestos, se han identificado nuevos inhibidores de la tripanotión sintetasa.

En este trabajo se describe la puesta a punto de ensayos para detectar inhibidores de la tripanotión sintetasa de *T. brucei* y de la proliferación de la forma infectiva de este parásito. El cribado dirigido contra un blanco (tripanotión sintetasa) y fenotípico (viabilidad celular) de una quimioteca de 422 compuestos con una amplia diversidad estructural y funcional nos permitió identificar nuevas moléculas con potentes actividades inhibitorias sobre la enzima y el crecimiento del patógeno.

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>Pág. 7</b>
<b>1.1 <i>Trypanosoma brucei</i></b>	<b>Pág. 7</b>
<b>1.1.1</b> Características generales	<b>Pág. 7</b>
<b>1.1.2</b> Tripanosomiasis Africana	<b>Pág. 9</b>
1.1.2.1 Transmisión	<b>Pág. 10</b>
1.1.2.2 Distribución geográfica	<b>Pág. 10</b>
<b>1.2 Tratamientos disponibles</b>	<b>Pág. 12</b>
<b>1.2.1</b> Ventajas y desventajas	<b>Pág. 12</b>
<b>1.2.2</b> Nuevos candidatos farmacológicos en evaluación	<b>Pág. 14</b>
<b>1.3 Blancos Terapéuticos</b>	<b>Pág. 15</b>
<b>1.3.1</b> Métodos y criterio de identificación	<b>Pág. 15</b>
<b>1.3.2</b> Validación como diana molecular	<b>Pág. 16</b>
<b>1.3.3</b> Tripanotión sintetasa: Caracterización bioquímica y biológica	<b>Pág. 17</b>
<b>1.4 Candidatos a fármacos</b>	<b>Pág. 21</b>
<b>1.4.1</b> Estrategia y proceso de búsqueda	<b>Pág. 21</b>
<b>1.4.2</b> Criterios de selectividad, definición de <i>hit</i> y <i>lead</i>	<b>Pág. 22</b>
<b>1.5 Diseño racional de compuestos</b>	<b>Pág. 23</b>
<b>1.5.1</b> Datos bioquímicos, estructurales y biológicos del blanco molecular	<b>Pág. 23</b>
<b>1.5.2</b> Estrategia de retroalimentación	<b>Pág. 24</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>Pág. 25</b>
<b>2.1 Objetivo general</b>	<b>Pág. 25</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>Pág. 25</b>

<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>Pág. 26</b>
3.1	<b>Biología molecular</b>	<b>Pág. 26</b>
3.1.1	Construcciones de ADN utilizadas	<b>Pág. 26</b>
3.1.2	Preparación y transformación de células competentes	<b>Pág. 27</b>
3.1.3	Purificación de ADN plasmídico	<b>Pág. 28</b>
3.2	<b>Expresión, purificación y análisis de proteínas recombinantes</b>	<b>Pág. 29</b>
3.2.1	Expresión heteróloga	<b>Pág. 29</b>
3.2.2	Purificación	<b>Pág. 30</b>
3.2.3	Electroforesis	<b>Pág. 31</b>
3.2.4	Determinación de la concentración	<b>Pág. 32</b>
3.3	<b>Ensayos de actividad tripanotión sintetasa</b>	<b>Pág. 32</b>
3.3.1	Ensayo cinético	<b>Pág. 32</b>
3.3.2	Ensayo de punto final	<b>Pág. 34</b>
3.4	<b>Ensayos de actividad biológica <i>in vitro</i> contra parásitos</b>	<b>Pág. 35</b>
3.4.1	Cultivo de parásitos	<b>Pág. 35</b>
3.4.2	Ensayo semiautomatizado	<b>Pág. 36</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>Pág. 38</b>
4.1	<b>Producción y caracterización de las <i>TbTryS</i></b>	<b>Pág. 38</b>
4.1.1	Expresión y purificación de las enzimas	<b>Pág. 38</b>
4.1.2	Determinación de parámetros cinéticos	<b>Pág. 41</b>
4.2	<b>Ensayo de actividad de punto final</b>	<b>Pág. 43</b>
4.2.1	Puesta a punto	<b>Pág. 43</b>
4.2.2	Algoritmo de trabajo	<b>Pág. 45</b>
4.3	<b><i>Screening</i> primario de compuestos</b>	<b>Pág. 46</b>
4.3.1	Identificación de <i>hits</i> y determinación de $CI_{50}$	<b>Pág. 46</b>
4.3.2	Análisis de secuencias de <i>TbTryS</i>	<b>Pág. 50</b>

<b>4.4 Actividad biológica contra la forma infectiva de <i>T. brucei</i></b>	<b>Pág. 53</b>
<b>4.4.1</b> Puesta a punto del ensayo	<b>Pág. 53</b>
<b>4.4.2</b> Identificación de <i>hits</i>	<b>Pág. 55</b>
<b>4.4.3</b> Cálculo de CE <sub>50</sub>	<b>Pág. 58</b>
<b>4.4.4</b> Uso del biosensor redox ro-GFP2	<b>Pág. 61</b>
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>Pág. 63</b>
<b>6 AGRADECIMIENTOS</b>	<b>Pág. 67</b>
<b>7 REFERENCIAS</b>	<b>Pág. 68</b>

# ABREVIATURAS

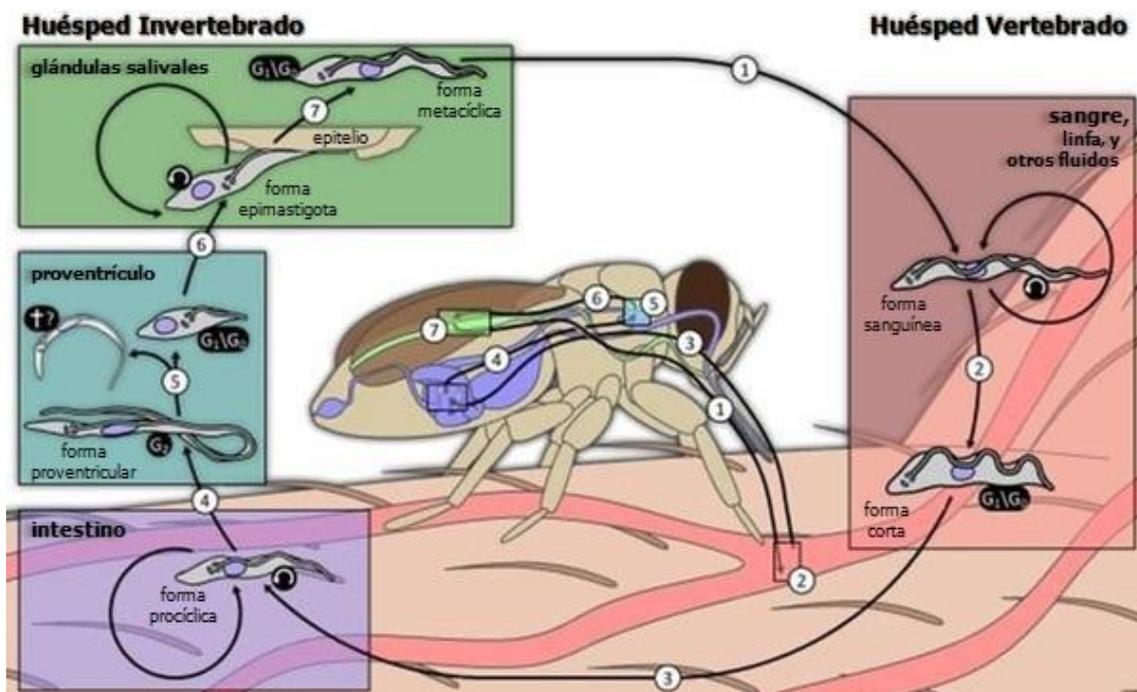
**A** , Ampère; **ADME**, Absorción, distribución, metabolización y eliminación; **ADN**, Ácido desoxirribonucleico; **ADP**, Difosfato de adenosina; **Amp**, Ampicilina; **APS**, Persulfato de amonio; **ARN**, Ácido ribonucleico; **ATP**, Trifosfato de adenosina; **BCA**, Ácido bicinónico; **BSA**, Albúmina sérica bovina; **C<sub>f</sub>**, Concentración final; **CV**, Cribado virtual; **DMSO**, Dimetilsulfóxido; **DO**, Densidad óptica; **DTT**, 1,4-ditiotreitol; **EDTA**, Ácido etilendiaminotetraacético; **FBS**, Suero fetal bovino; **FPLC**, Cromatografía líquida rápida de proteínas; **FSC**, *Forward-scatter*, detector de dispersión frontal; **GFP**, Proteína verde fluorescente; **Grx**, Glutarredoxina; **GSH**, Glutación reducido; **Gsp**, Glutationil espermidina; **GSSG**, Glutación oxidado; **H2L**, *Hit to Lead* ; **HEPES**, Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico; **HTS**, Cribado de alto rendimiento; **IEC**, Cromatografía de intercambio iónico; **IMAC**, Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados; **IPTG**, Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido; **LB**, Caldo de cultivo Luria-Bertani; **LDH**, L-lactato deshidrogenasa; **MR**, Mezcla de reacción; **NADH**, Nicotinamida adenina dinucleótido (reducido); **NADP**, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **NMR**, Resonancia Magnética Nuclear; **OMS**, Organización Mundial de la Salud; **PBS**, Tampón fosfato salino; **PEP**, Fosfoenolpiruvato; **Pi**, fosfato inorgánico; **PK**, Piruvato quinasa; **PMSF**, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo; **S**, desviación estándar muestral corregida; **SDS**, Dodecilsulfato de sodio; **SDS-PAGE**, Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida; **SEC**, Cromatografía de exclusión molecular; **SPD**, Espermidina; **SSC**, *Side-scatter*, detectores de dispersión lateral; **TB**, Caldo de cultivo *Terrific*; **TbTryS**, Tripanotión sintetasa de *Trypanosoma brucei*; **TEMED**, Tetrametiletildiamina; **TET**, Tetraciclina; **TLCK**, N-α-tosil-L-lisina clorometil cetona; **TryS**, Tripanotión sintetasa; **T(SH)<sub>2</sub>**, Tripanotión.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Trypanosoma brucei*

### 1.1.1 Características generales

El parásito *Trypanosoma brucei*, es un protozoo flagelado del orden *Kinetoplastida* que causa la "enfermedad del sueño" en humanos y la enfermedad "Nagana" en el ganado (Steenkamp 2002). Su ciclo de vida se divide en 2 etapas: una que incluye la infección del huésped mamífero (ganado u hombre) y otra de desarrollo en un insecto o vector biológico (mosca hematófaga del género *Glossina* conocida como mosca tse-tse). *T. brucei* es un parásito extracelular que coloniza la sangre y los fluidos intersticiales de sus hospederos mamíferos y vector. El ciclo de vida se detalla en la Figura 1.



**Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*.** Una mosca infectada (1) inyecta tripomastigotes metacíclicos en el tejido epitelial (2). Los parásitos ingresan al sistema linfático y de allí pasan al torrente sanguíneo (3). Dentro del huésped se transforman en tripomastigotes sanguíneos, los cuales proliferan por fisión binaria y son capaces de colonizar la linfa y el líquido cefalorraquídeo. Luego de ser ingeridos por el vector, los parásitos se transforman en tripomastigotas procíclicas en el intestino de la mosca (4), donde se multiplican y se transforman en epimastigotes (6). Los epimastigotes migran del intestino medio (5) hacia las glándulas salivales de la mosca donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos, no replicativos (7). El ciclo de vida en la mosca tarda aproximadamente 3 semanas (modificado de <http://www.richardwheeler.net>).

Cuando una mosca tse-tse infectada pica a un mamífero le inyecta junto con la saliva la forma infectiva del parásito. El parásito se multiplica primariamente en el sitio de infección durante cerca de 3 días, lo cual comúnmente da lugar al desarrollo de un edema inflamatorio que desaparece después de 3-4 semanas. Luego el patógeno se disemina por todo el cuerpo a través del torrente sanguíneo, iniciando la fase aguda de la enfermedad. En el huésped vertebrado la forma tripomastigota se multiplica por fisión binaria, pero a diferencia de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.*, *T. brucei* no invade células y tejidos, sino que habita en fluidos incluyendo sangre, linfa y líquido cefalorraquídeo (CDC 2012).

Los tripomastigotes sanguíneos están recubiertos en su superficie con una densa capa de glicoproteínas de membrana; si bien *T. brucei* cuenta con un repertorio de cerca de 1000 genes codificantes para esas proteínas, solo uno de ellos es expresado por la población de parásitos (Marcello 2007). El sistema inmune produce anticuerpos específicos contra la glicoproteína dominante, lo que permite eliminar la mayoría de los parásitos circulantes y controlar la infección; sin embargo, mediante mecanismos epigenéticos aleatorios algunos clones de parásitos activan la expresión de una variante diferente de la glicoproteína de superficie logrando así escapar al reconocimiento y ataque del sistema inmune. Estos parásitos se multiplicarán y darán origen a una nueva onda de parasitemia clonal y a un nuevo ciclo de control de la infección por respuesta inmune humoral (Stockdale 2008). La cronicidad de este fenómeno acarrea una gran producción de anticuerpos que llevan a la formación de complejos, que activan la vía del complemento y causan daños directos en los endotelios de los vasos y en los riñones. Los daños en los vasos generan edemas y micro-infartos en el cerebro, mientras la anemia es debida a la destrucción de los eritrocitos por lisis mediada por complemento, pero fundamentalmente por macrófagos del sistema retículo endotelial (Botero 2003).

### 1.1.2 Tripanosomiasis Africana

La tripanosomiasis humana africana, también conocida como “enfermedad del sueño” es causada por dos subespecies distintas de *Trypanosoma brucei*: *rhodesiense* y *gambiense*. *T. b. rhodesiense* representa menos del 5% de los casos diagnosticados, la enfermedad que produce se desarrolla muy rápidamente y genera una infección aguda, observándose los primeros síntomas a las pocas semanas o pocos meses después de la infección, conduciendo a la muerte en cuestión de semanas o en un lapso menor a 2 años (OMS 2012). Por el contrario, las infecciones por *T. b. gambiense* son más frecuentes y representan el 95% de los casos de tripanosomiasis humana (OMS 2012). Esta enfermedad tiene un desarrollo más lento donde el paciente puede pasar meses o años sin o con manifestaciones esporádicas de la misma. Sobre la fase final de la enfermedad y cuando los síntomas se hacen evidentes, el parásito ha logrado atravesar la barrera hemato-encefálica comprometiendo al sistema nervioso central (Kennedy 2006a).

Dos etapas caracterizan el desarrollo de la enfermedad del sueño: la primera etapa, conocida como fase hemolinfática, se manifiesta con ciclos de fiebre muy elevada y periodos afebriles durante varios días, jaquecas, debilidad intensa, dolores de articulaciones, taquicardias, anemia, edema intenso, alteraciones circulatorias, pérdida de peso y prurito (picazón). Los primeros sistemas afectados son el cardiovascular, renal y endócrino. La segunda fase, conocida como fase neurológica, comienza cuando el parásito atraviesa la barrera hematoencefálica e invade el sistema nervioso central. En general cuando esto ocurre se observan cambios en el comportamiento y carácter del individuo (por ej. indiferencia, irritabilidad). Durante el día aparecen periodos de somnolencia, cada vez más frecuentes y prolongados (motivo por el cual se le llama “enfermedad del sueño”) mientras que por la noche se sufre de insomnio. Esta enfermedad también se caracteriza por cursar con una marcada artralgia e hipersensibilidad a estímulos mecánicos y dolor (signo de Kerandel).

La enfermedad del sueño es curable con medicación. Pero sin tratamiento es letal ya que el deterioro irreversible de órganos y funciones vitales conducirá a la muerte (Kennedy 2006b).

### 1.1.2.1 Transmisión

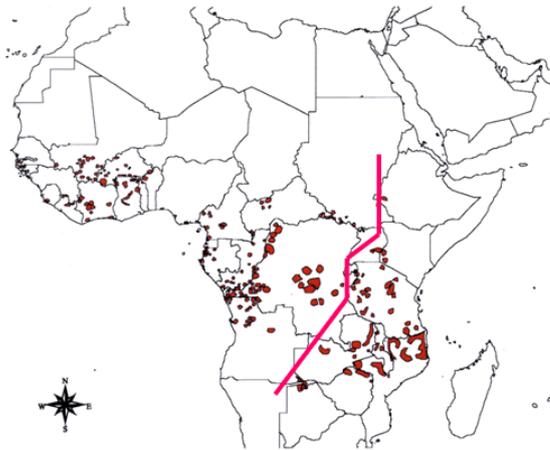
Esta enfermedad es transmitida por la picadura de la mosca tse-tse, un insecto del género *Glossina*. Estos insectos se encuentran principalmente en áreas rurales del África subsahariana y sólo algunas especies de la mosca son transmisoras de la enfermedad (Van Den Abbeele 1999). Su hábitat incluye la vegetación costera de ríos y lagos, los bosques y la sabana. Dado que no existe la transmisión vertical del parásito en el vector, solo en zonas endémicas de tripanosomiasis se encontrarán moscas infectadas.

Las regiones más afectadas son aquellas donde los sistemas de salud son precarios o inexistentes y donde la población depende de la agricultura, pesca, cría o caza de animales y por ende está más expuesta a la picadura de la mosca y en consecuencia, a la infección. La enfermedad comienza a diseminarse en pequeños asentamientos pero los desplazamientos humanos por guerras y pobreza conducen a un aumento en la tasa de transmisión y a su expansión a aldeas y regiones más extensas; la migración y el turismo intercontinental la ha llevado incluso a otros países, aunque siempre se ha tratado de casos puntuales que no derivaron en epidemias (Brun 2010).

Otras vías de transmisión de la enfermedad que han sido reportadas lo constituyen: a) la vía congénita (el tripanosoma puede cruzar la placenta e infectar al feto) y b) la transmisión mecánica en laboratorios de investigación que trabajan con cepas infectivas.

### 1.1.2.2 Distribución geográfica

*T. b. gambiense* es endémico de África central y occidental, mientras que *T. b. rhodesiense* lo es en el sur y este de este continente (Figura 2).



**Figura 2. Distribución geográfica de las subespecies de *Trypanosoma brucei*.** A la izquierda de la línea roja (occidente) predomina *T. b. gambiense* y a la derecha (oriente) *T. b. rhodesiense*. Los puntos naranjas representan los focos infecciosos. Actualmente, la enfermedad del sueño abarca 36 países del África sub-sahariana poniendo en riesgo de infección a más de 60 millones de personas. La incidencia anual es de aproximadamente 300.000 casos y el área donde se puede hallar al vector ocupa un tercio de la totalidad de África (Kennedy 2004).

Imagen de [http://www.finddiagnostics.org/programs/hat-ond/hat/about\\_hat.html](http://www.finddiagnostics.org/programs/hat-ond/hat/about_hat.html).

Durante el siglo XIX, más precisamente entre 1896 y 1906, se reportaron focos en Uganda y la cuenca del Congo (Louis 2005). Más tarde, en 1920, se descubrieron casos en diversos países africanos, pero fueron controlados gracias a los equipos móviles que organizaron el monitoreo de millones de personas en las áreas de riesgo. Para mediados de los años 60, se creía que la tripanosomiasis humana africana estaba bajo control. Sin embargo, la flexibilización de la vigilancia junto con el abandono de países europeos de distintas colonias africanas, coincidió con la reaparición de personas infectadas en varias áreas, a lo largo de los últimos 50 años. Recientemente los esfuerzos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con programas de control nacionales y organizaciones no gubernamentales, han frenado y revertido la tendencia creciente de casos (Kuzoe 1993).

Los brotes más importantes de la última década han sido reportados en 2005 en Angola, República Democrática del Congo y Sudán. Es difícil estimar la situación actual en un número de países endémicos debido a la falta de seguimiento, vigilancia y pericia de diagnóstico. De acuerdo al Centro de Control y Prevención de Enfermedades, los datos estadísticos del año 2012 indican alrededor de 10.000 nuevos casos por año (CDC 2012), pero se cree que el número es mayor ya que muchas infecciones no son diagnosticadas.

Queda en evidencia entonces que las tripanosomiasis africanas son y han sido desde siempre un serio problema de salud pública en dicho continente.

## **1.2 Tratamientos disponibles**

### **1.2.1 Ventajas y desventajas**

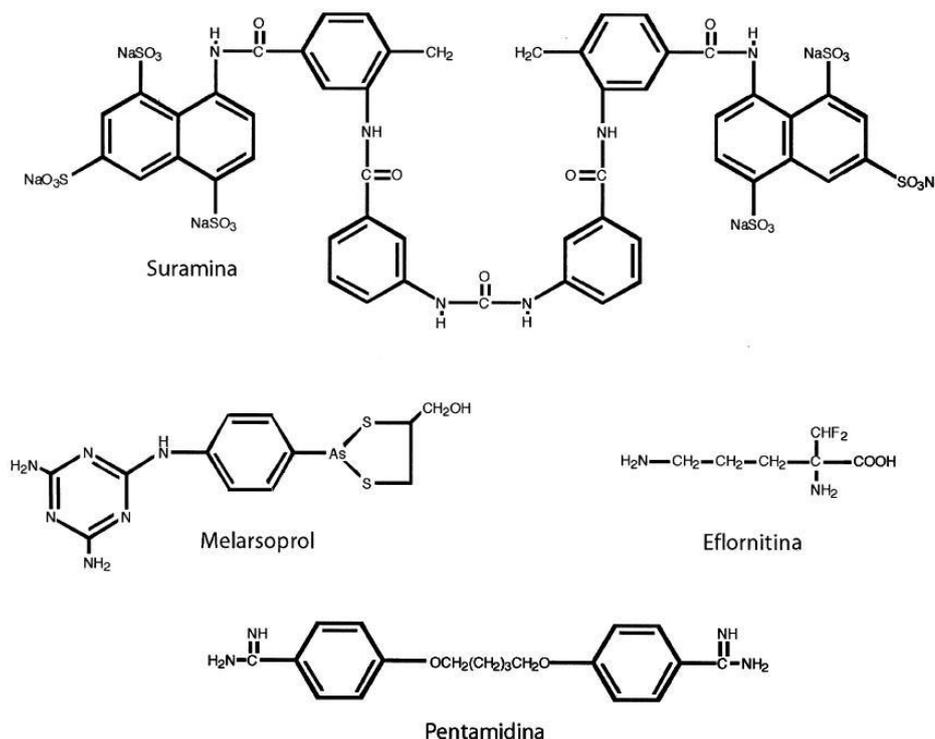
El tipo de tratamiento aplicado va a depender de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. Las drogas utilizadas en la primera etapa de la enfermedad son menos tóxicas y más efectivas; esto quiere decir que cuanto más temprano se detecta la infección, hay mayores probabilidades de sanar al paciente. En la segunda etapa, el éxito del tratamiento dependerá de la habilidad de la droga administrada para atravesar la barrera hematoencefálica, y actuar contra el parásito que invadió el sistema nervioso central. Tales fármacos son bastante tóxicos, deben ser administrados de manera frecuente y prolongada y requieren la hospitalización del paciente (Barrett 2007). Hasta ahora, tan solo cinco medicamentos han sido registrados y aprobados para el tratamiento de la enfermedad del sueño y son entregados gratuitamente a los países endémicos a través de una asociación público-privada entre la OMS y Sanofi-Aventis o Bayer AG.

Los tratamientos para la primera etapa son: pentamidina de Sanofi-Aventis y Suramina de Bayer AG (Figura 3A). La pentamidina fue descubierta en 1941, y es usada principalmente contra *T. b. gambiense*. Tiene pocos efectos secundarios indeseables, y es bien tolerada por los pacientes. La suramina es anterior, se descubrió en 1921, y se usa principalmente contra *T. b. rhodesiense*. Debe tenerse en cuenta que provoca trastornos en el tracto urinario y reacciones alérgicas (Nok 2003).

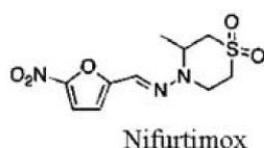
El tratamiento de la segunda etapa comprende el uso de melarsoprol de Sanofi-Aventis, descubierta en 1949, y utilizado contra ambas subespecies de patógenos; o eflornitina también de Sanofi-Aventis, registrada en 1990 pero solo efectiva contra *T. b. gambiense* (Figura 3A). El melarsoprol es un compuesto derivado de arsénico y cuyo consumo conlleva diversos efectos colaterales siendo el más dramático un síndrome encefalopático, el cual es fatal

en un 3 al 10% de los pacientes. Como si fuera poco, se viene dando un aumento de la resistencia a esta droga, particularmente en varios lugares de África central. La eflornitina es una alternativa al tratamiento con melarsoprol ya que esta molécula es menos tóxica que la otra, pero requiere de un régimen estricto de administración (intravenosa) bajo hospitalización (Docampo 2003). Por eso es que en 2009 se propuso una nueva estrategia para el tratamiento de la enfermedad del sueño producida por *T. b. gambiense* que combina la eflornitina con nifurtimox. El nifurtimox (Figura 3B) está registrado para el tratamiento de la tripanosomiasis americana o mal de Chagas, pero no contra la tripanosomiasis humana africana. No obstante, luego de ciertos ensayos clínicos que demostraron su eficacia y seguridad (Priotto 2009) se aceptó su uso en combinación con eflornitina y se incluyó en la lista de medicamentos esenciales de la OMS y es distribuido gratuitamente para este uso.

A)



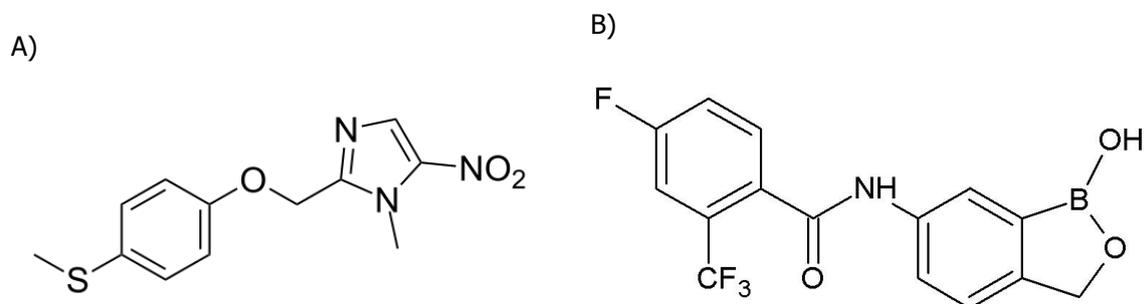
B)



**Figura 3. Estructura de los fármacos actualmente disponibles para tratar la enfermedad del sueño.** A) La suramina es un derivado simétrico de naftaleno polisulfurado, el melarsoprol es un compuesto orgánico que contiene arsénico, la eflornitina es un análogo al aminoácido ornitina y la pentamidina es una diamina. B) el nifurtimox es un nitroheterociclo.

### 1.2.2 Nuevos candidatos farmacológicos en evaluación

La escasez, alta toxicidad, baja eficacia, y difícil administración de los actuales tratamientos, sobre todo para la etapa avanzada (crónica) de la enfermedad, hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos más seguros y efectivos. El fexinidazol (Figura 4A), un nitroimidazol redescubierto por la Iniciativa “Medicamentos para Enfermedades Olvidadas” (DNDi en inglés), está siendo evaluado como candidato para el tratamiento oral de corta duración de la forma aguda y crónica de la tripanosomiasis africana. Ya fueron realizados los controles farmacocinéticos y preclínicos necesarios para cumplir con las normativas de seguridad exigidas por las regulaciones internacionales antes de testearse en humanos (DNDi 2013). En animales de laboratorio el fexinidazol presenta una muy buena absorción y biodistribución, incluyendo el cerebro, luego de la administración oral. Los estudios toxicológicos demostraron que es bien tolerado y no es genotóxico para células de mamíferos (Torreele 2010). En setiembre de 2009 este compuesto fue ingresado en la fase 1 de ensayos clínicos en humanos y hoy en día se avanzó hasta fase IIb/III.



**Figura 4. Estructura de los fármacos que están siendo evaluados como posibles candidatos para el tratamiento de la enfermedad del sueño.** A) Fexinidazol. B) SCYX-7158.

Otro compuesto descubierto y optimizado para su uso como medicamento contra la enfermedad del sueño es una pequeña molécula que contiene boro (benzoxaborol) llamada SCYX-7158 (Figura 4B). Este demostró ser activo *in vitro* contra *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* y también en modelos murinos de las dos etapas de la enfermedad. Las propiedades de absorción, distribución, metabolización y eliminación (ADME) indican que el compuesto puede ser

administrado vía oral, es metabólicamente estable y capaz de penetrar la barrera hemato-encefálica (Jacobs 2011). En 2011 ha sido seleccionado para entrar en etapa de ensayos preclínicos con la posibilidad de avanzar a fase 1 de ensayos clínicos en humanos. Actualmente se encuentra en fase I (<https://clinicaltrials.gov/>).

## **1.3 Blancos Terapéuticos**

### **1.3.1 Métodos y criterio de identificación**

Existen distintas estrategias para lograr la identificación de compuestos químicos o naturales con potencial farmacológico para tratar distintas afecciones y/o enfermedades, sean estas infecciosas o no. Los grandes avances que tuvieron lugar en las últimas décadas en las áreas de genómica, biología estructural, proteómica y genética funcional de organismos patógenos y el ser humano han facilitado la búsqueda, identificación y caracterización de blancos terapéuticos. Además de contribuir al descubrimiento de nuevos candidatos a fármacos, estas técnicas y disciplinas contribuyeron a la exploración del modo de acción de los medicamentos, las reacciones adversas y las implicaciones farmacogenéticas (ej. variación de secuencias génicas y perfiles de expresión, y procesamiento postraducciona l de proteínas) si las hubiera (Zheng 2006).

Un blanco terapéutico debe reunir ciertas características para definirse como tal, las cuales incluyen: cumplir un rol crítico y preferentemente insustituible en la forma infectiva del parásito o en el proceso de la enfermedad, y poseer características estructurales y funcionales distintivas para lograr su inhibición selectiva y limitar efectos colaterales en humanos.

La concentración intracelular de estos blancos debe ser baja para permitir reducir la dosis de compuesto a emplear y por lo tanto su eventual toxicidad. Los sitios de unión a inhibidores deben tener ciertas propiedades estructurales y fisicoquímicas que permitan acomodar fármacos con alta afinidad de unión y especificidad (Hopkins 2002). La elucidación de estas propiedades del blanco farmacológico requiere del estudio bioquímico, biológico, estructural y

molecular del mismo, así como también de las rutas metabólicas o procesos celulares asociados.

### 1.3.2 Validación como diana molecular

Con respecto a las técnicas empleadas para la validación genética y caracterización funcional de genes, éstas consisten en regular positiva o negativamente la expresión de la secuencia en estudio para observar los cambios fenotípicos atribuibles a esa modificación (Ilag 2002). Por ejemplo: el reemplazo génico o *knock-out* (K.O.) se consigue insertando un plásmido linealizado que contiene un marcador selectivo flanqueado por los fragmentos 5' y 3' del locus del gen de interés (NHGRI 2013). La represión o sobreexpresión inducible de un gen se puede lograr mediante el empleo de vectores de integración que permiten la expresión o represión inducible por tetraciclina del gen de interés (Wirtz 1995). Otra estrategia es la de "dominante negativo" en la cual la expresión de un mutante de la proteína endógena afecta adversamente, por competencia con la forma salvaje, la actividad biológica de esta última.

A pesar de la cantidad de métodos existentes, el más utilizado actualmente para *T. brucei* es sin dudas la generación de ARN doble hebra (ARNds) el cual permite el silenciamiento post-transcripcional de un gen específico (Sharp 1999). En el modelo actual, el ARNds es digerido dentro de la célula para dar lugar a cortos segmentos de ARN interferente (siARN) que son replicados por una ARN polimerasa ARN-dependiente, y que luego se unen a un complejo de nucleasas que catalizan la degradación específica del ARNm diana (Bass 2000).

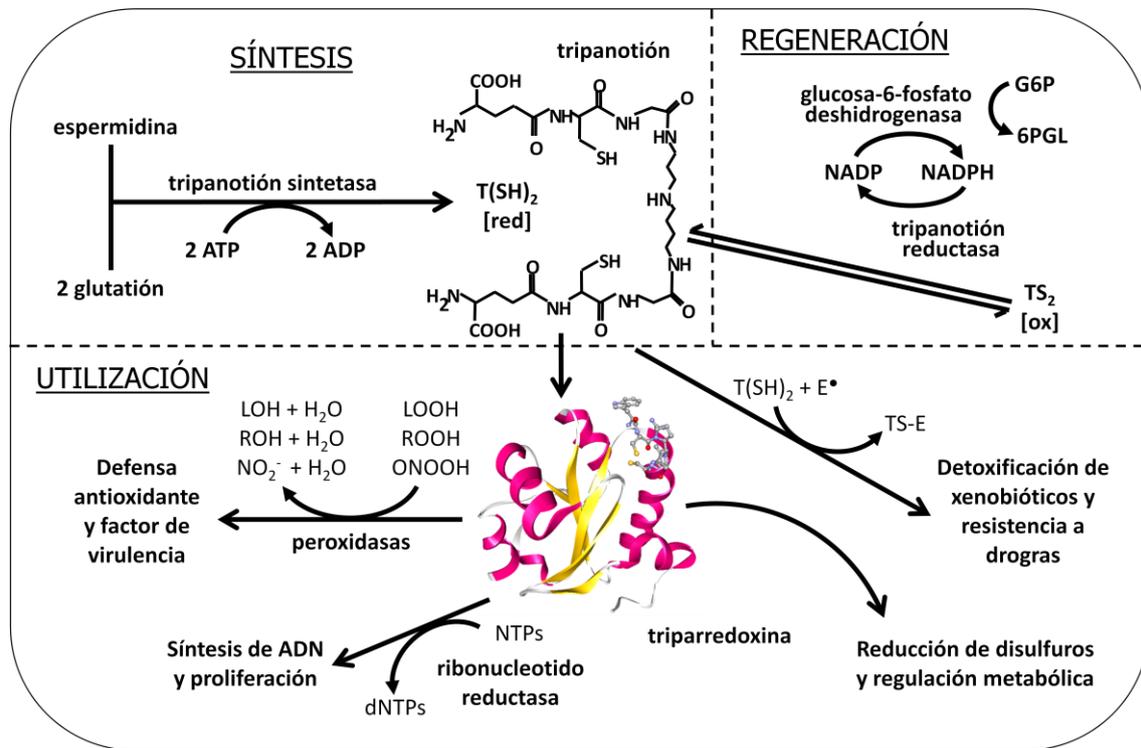
En cuanto a los métodos de validación de blancos a nivel proteico se puede decir que todavía están en vías de desarrollo, pero se espera que en un futuro puedan complementar o superar a los genéticos. Se ha incursionado por ejemplo en el uso de anticuerpos micro-inyectados directamente dentro de células de mamífero (Morris 2001) o producidos por las mismas y que puedan unirse específicamente a una proteína y neutralizar su función, o el uso de aptámeros que son secuencias cortas de oligonucleótidos capaces de unirse con

especificidad a las proteínas gracias a su particular estructura tridimensional (Tuerck 1997), e incluso en la utilización de péptidos como inhibidores competitivos de actividad catalítica o de interacción proteína-proteína de manera tal de interferir con su función biológica (Caponigro 1998). Los últimos avances incluyen la utilización de un cromóforo con propiedades fotoquímicas especiales unido a alguna de estas moléculas de reconocimiento (anticuerpos, aptámeros o péptidos), lo que se conoce como inactivación láser asistida por cromóforo o CALI por su sigla en inglés. Esta técnica implica la generación de radicales de vida corta, limitando así el radio de las modificaciones covalentes a sitios espacialmente restringidos en la molécula blanco. Si estos radicales modifican aminoácidos en una proteína que es responsable de cierta función, se observará una inactivación transitoria de dicha función (Rubenwolf 2002). También se emplean estrategias de cribado de pequeñas moléculas y su capacidad para modular una ruta metabólica sin la necesidad de tener un blanco específico. La clave está en lograr sintetizar una colección eficiente de estas pequeñas moléculas capaces de alterar un proceso biológico conduciendo eventualmente a la identificación del blanco terapéutico que está siendo perturbado (Schreiber 2000) y lo más novedoso es un arreglo en formato tipo microchip que presenta miles de proteínas funcionales en su superficie, mediante los cuales se podrá estudiar por ejemplo la interacción de dichas proteínas con otras proteínas o fosfolípidos (Zhu 2001).

### **1.3.3 Tripanotión sintetasa: Caracterización bioquímica y biológica**

Los tripanosomátidos tienen una ruta metabólica exclusiva, que consiste en la biosíntesis y uso de  $N^1, N^8$  bis(glutathionil) espermidina (Fairlamb 1985), un ditiol de bajo peso molecular llamado tripanotión, o  $T(SH)_2$  para abreviar. En *T. brucei* hay una sola enzima bifuncional encargada de catalizar ambos pasos de la reacción de biosíntesis de  $T(SH)_2$  así como las reacciones reversas de hidrólisis para formar nuevamente los sustratos (Figura 5). Esta enzima es una C-N ligasa dependiente de ATP denominada tripanotión sintetasa (EC 6.3.1.9) y

su rol e importancia en cuanto a la viabilidad y virulencia del parásito han sido ampliamente demostrados.



**Figura 5. Biosíntesis de tripanotión y su papel en diversas rutas metabólicas.** La reacción de síntesis de tripanotión consiste en la sucesiva adición de dos moléculas de glutatión a una de espermidina (en primer lugar se forma el intermediario glutationilespermidina y posteriormente se adiciona la segunda molécula de glutatión) a expensas de ATP (Comini 2003). LOOH = lipoperóxidos, ONOOH = peroxinitrito, E° = compuesto electrófilo.

La forma recombinante de esta enzima fue analizada por espectrometría de masa mostrando un peso molecular de 71,963 Dalton y por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) migró con un peso molecular aparente de ~ 72 KDa (Oza 2003). En una resina de filtración por gel se comporta como una especie homogénea y monomérica. Tiene dos dominios catalíticos estructuralmente distintos, uno C-terminal que posee la actividad sintetasa y otro N-terminal con actividad amidasa el cual tiene homología con dominios de cisteín-proteasas como la papaína (Lin 1997).

En cuanto al comportamiento cinético de la enzima, en condiciones saturantes de Mg<sup>2+</sup>-ATP y espermidina, se observa una pronunciada inhibición por GSH por encima de 0,1 mM. Para el resto de los sustratos la cinética sigue una hipérbola simple y las K<sub>m</sub> reportadas son 38 μM para SPD, 2,4 μM para Gsp y 7,1 μM para Mg<sup>2+</sup>-ATP (Oza 2003). El mecanismo de la reacción planteado hasta el

momento consiste en la unión parcialmente ordenada de los tres sustratos a la enzima. La reacción se inicia con la fosforilación de GSH por el ATP seguido de la conjugación de espermidina al GSH fosforilado que da lugar al intermediario glutationilespermidina y liberación de Pi y ADP (Leroux 2013). En el segundo paso, se repite la activación de GSH por fosforilación y la formación de un complejo cuaternario con Gsp que finalmente dará lugar a la formación de T(SH)<sub>2</sub> y una nueva ronda de liberación de ADP y Pi (Comini 2005; Leroux 2013). Cabe notar que tanto SPD como Gsp compiten por el mismo sitio de unión y que T(SH)<sub>2</sub> y GSH inhiben la reacción al mantenerse unidos a la enzima.

La indispensabilidad de la tripanotión sintetasa (TryS) para la sobrevivencia del parásito *in vitro* e *in vivo* fue demostrada mediante interferencia por ARN doble hebra y *knock-out* condicional en la forma infectiva de *T. brucei* (Comini 2004, Wyllie 2009). Esto puso en evidencia la precariedad del sistema redox dependiente de tioles en estos organismos, el cual al carecer de enzimas como la tiorredoxina reductasa y glutatión reductasa, depende estrictamente del poder reductor de T(SH)<sub>2</sub> para abastecer distintas funciones celulares (Figura 5). En estos parásitos, el tripanotión es el equivalente al glutatión (GSH) de mamíferos ya que actúa como cofactor redox en varios procesos como ser la reducción de hidroperóxidos catalizada por distintos tipos de peroxidasas y la síntesis de ribonucleótidos por la ribonucleótido reductasa. Estas y otras reacciones de óxido-reducción están mediadas por distintas tiol/disulfuro reductasas conocidas como redoxinas (ej. tiorredoxina, glutarredoxina y triparredoxina) entre las que se destaca la triparredoxina por su especificidad y eficiencia catalítica por T(SH)<sub>2</sub>, y cuya actividad demostró ser indispensable para la viabilidad de estos parásitos (Manta 2013).

Las ventajas que presenta la TryS como blanco de acción de fármacos es que, a diferencia de la triparredoxina y las triparredoxinas peroxidasas, esta enzima es poco abundante (2,1 – 3,4 μM) (Fiestas, no publicado), por lo cual debería ser más fácilmente inhibida. También es importante destacar que la TryS es una enzima exclusiva de tripanosomátidos y salvo por algún motivo de unión a ATP,

no tiene identidad de secuencia significativa con ninguna proteína de mamíferos (Comini 2004).

Se realizaron varios esfuerzos mediante distintos abordajes para identificar inhibidores de la glutationilperimidina sintetasa y de la TryS. En una primera instancia se diseñaron y produjeron una serie de tripéptidos estructuralmente relacionados al glutatión (De Craecker 1997), posteriormente se sintetizaron fosfinopéptidos análogos a glutationilperimidina (Chen 1998) y derivados de ácido borónico (Amssoms 2002) con resultados interesantes. Se ha testado la actividad biológica de unos pocos derivados de glutatión siendo la  $CE_{50}$ <sup>1</sup> del compuesto más activo 1,9  $\mu$ M contra *T. brucei* (D'Silva 2000). Sin embargo, no se detectó actividad inhibitoria de análogos amida de GSH por debajo de 7  $\mu$ M contra *T. cruzi* (Ravaschino 2006).

Lo último en este campo fue la validación química de la TryS como blanco mediante el cribado de una biblioteca de más de 60.000 compuestos llegándose a reportar y caracterizar 4 nuevos inhibidores (DDD60632 = 2-(tert-butilsulfonilmetil)-4-(3-fluorofenil)tiazol, DDD73385 = 1-(5-(3,5-diclorofenil)-2H-tetrazol-2-il)-3,3-dimetilbutan-2-ona, DDD85811 = 1-(3-(3-fluorofenil)-1H-indazol-1-il)-3,3-dimetilbutan-2-ona y DDD86243 = 2-(3-(3-fluorofenil)-1H-indazol-1-il)-1-(piperidin-1-il)etanona), que además retienen actividad inhibitoria contra esta enzima y citotóxica contra cultivos de la forma infectiva de *T. brucei* (Torrie 2009). Las  $CI_{50}$  contra la TryS reportadas para estos compuestos son: DDD60632 = 0,273  $\mu$ M, DDD73385 = 0,317  $\mu$ M, DDD85811 = 0,095  $\mu$ M, DDD86243 = 0,140  $\mu$ M y las  $CE_{50}$  contra el parásito son: DDD60632 = 27,1  $\mu$ M, DDD73385 = 21,2  $\mu$ M, DDD85811 = 8,8  $\mu$ M, DDD86243 = 5,1  $\mu$ M.

---

<sup>1</sup> Se define la  $CE_{50}$  como la concentración de un compuesto necesaria para reducir in vitro el crecimiento poblacional de un organismo en un 50% y la  $CI_{50}$  como la concentración de un compuesto necesaria para reducir in vitro la actividad enzimática en un 50%.

## 1.4 Candidatos a fármacos

### 1.4.1 Estrategia y proceso de búsqueda

El descubrimiento de nuevos fármacos no es una tarea sencilla, como indican las altas tasas de fracaso de proyectos (uno de cada cinco) que entran en fase de desarrollo pre-clínica y menos de 1 de cada 10 de los que pasan la etapa clínica son luego registrados para uso clínico. Muchos de estos proyectos fallan por carecer de sustento biológico y bioquímico sobre el blanco molecular, el organismo y la patología asociados al agente infeccioso; y otros por no considerar las características críticas que debe tener el producto terapéutico final para su uso en humanos (Brown 2003). Para que un determinado compuesto sea exitoso en los ensayos clínicos y presente beneficios sustanciales respecto a los fármacos existentes debe tener en cuenta la población objeto, el espectro de actividad, la dosis, vía de aplicación y frecuencia de la misma, seguridad y eficacia, posibilidad de aplicarse junto con otros medicamentos, pocas contraindicaciones, baja probabilidad de generar resistencia, estabilidad en climas tropicales y por sobre todo el costo (Wyatt 2011).

Históricamente, los fármacos eran descubiertos identificando el principio activo de remedios naturales o simplemente por casualidad, en la década de los 90s comenzó a analizarse el efecto terapéutico que producían pequeñas moléculas, productos naturales o extractos sobre células u organismos enteros, y así surgió lo que se conoce como farmacología básica; pero hoy en día con la evolución de las técnicas de secuenciación, clonado, síntesis y purificación de proteínas la estrategia más utilizada es la farmacología reversa. Se plantea la hipótesis que la modulación de la actividad de cierta proteína blanco tendría un efecto terapéutico beneficioso, luego se testean bibliotecas de compuestos químicos para identificar moléculas que interaccionen con mayor afinidad con el blanco y éstas son utilizadas como punto de partida para el diseño y/u optimización de nuevos candidatos a fármacos (Archer 2004).

Otro método comúnmente utilizado es el diseño racional de compuestos donde se estudian las propiedades fisicoquímicas y biológicas del blanco y se realiza una predicción de la clase de moléculas que pueden interactuar con el sitio activo. De estas instancias se suelen obtener muy rápidamente farmacóforos novedosos.

Otro método es el cribado virtual (CV) basado en simulaciones computacionales. Tiene como principal fortaleza el bajo costo que presenta frente a ensayos realizados en el laboratorio ya que no se necesita sintetizar ningún compuesto ni comprar una biblioteca. A veces se utiliza el CV para reducir la cantidad de compuestos que serán evaluados luego en el laboratorio y otro punto fuerte es que la cantidad de compuestos disponibles para realizar CV es significativamente mayor a la disponible para realizar HTS, es más, existe la posibilidad de testear compuestos que aun no han sido sintetizados. Sin embargo presenta desventajas tales como: 1) el requerimiento de datos estructurales, 2) se trata de predicciones, 3) puede no tener en cuenta la dinámica conformacional, 4) algunos compuestos que resulten del CV pueden ser difíciles de sintetizar. Por ello es que el *screening* virtual no puede sustituir al *screening* real; el *screening* real (RS) como por ejemplo el cribado de alta procesividad o *high-throughput screening* (HTS) permite estudiar experimentalmente la actividad de cientos de miles de compuestos por día contra un blanco determinado. Esto proporciona resultados confiables que contribuyen al refinamiento de las estructuras de los ligandos identificados, pero es altamente costoso (Bajorath 2002).

#### **1.4.1** Criterios de selectividad, definición de *hit* y *lead*

Como ya se mencionó, una de las vías más populares de encontrar candidatos a fármacos prometedores es investigar la inhibición o la interacción de la proteína blanco con moléculas que forman parte de una biblioteca de compuestos mediante técnicas de HTS. Muchas de estas bibliotecas son comerciales e incluyen de decenas a millones de compuestos. Los compuestos más efectivos obtenidos de este tamizaje son llamados "hits" ya que muestran interacción y actividad frente al blanco. Alguno de estos compuestos "hit" luego son

refinados y modificados para alcanzar interacciones más favorables y menos efectos colaterales ascendiendo a la categoría de "lead" o cabeza de serie (<http://www.combichemistry.com>).

El proceso global de una campaña de descubrimiento de nuevos candidatos a fármacos se presenta en la Figura 6.



**Figura 6. Etapas del desarrollo de un fármaco.** La etapa de "hit" a "lead" comienza con la confirmación y evaluación de los "hits" resultantes del cribado primario. Continúa con un proceso de optimización que busca mejorar las propiedades farmacocinéticas del compuesto para que puedan ser testeados en modelos animales de la enfermedad y reducir la posibilidad de efectos secundarios asociados al tratamiento. Finalmente se analiza la factibilidad de síntesis y producción en masa y por último (en teoría) se verifica si la estructura no ha sido patentada previamente (Keseru 2006). Los puntos de control típicos a lo largo de este proceso son: las series de *hits* validados (SHV), las series de *leads* identificados (SLI) y la selección de candidatos a estudios clínicos (SCC). Esto asegura que únicamente aquellos compuestos con un perfil de potencialidad lo suficientemente alto (orden nanomolar) avancen a las siguientes etapas de desarrollo (modificado de Bleicher 2003).

## 1.5 Diseño racional de compuestos

### 1.5.1 Datos bioquímicos, estructurales y biológicos del blanco molecular

El diseño racional de drogas se define como el proceso en el cual se descubren nuevos medicamentos basándose en el conocimiento bioquímico, biológico y estructural de un blanco molecular específico y el hecho de que interfiriendo con su función se puede lograr un efecto terapéutico significativo. Este abordaje se contrapone a la metodología tradicional de descubrimiento de fármacos basada en el cribado de sustancias químicas contra células en cultivo o en animales y luego relacionando el efecto con el tratamiento.

Hay dos grandes enfoques acerca del diseño racional de compuestos, está el diseño basado en el ligando y el diseño basado en estructura. Ambos pueden ser o no asistidos por métodos computacionales.

El primero requiere del conocimiento de las moléculas que interaccionen con el blanco y son las estructuras de dichos compuestos las que brindan un modelo de farmacóforo que define las características mínimas que debe tener un determinado compuesto para unirse al blanco. El segundo enfoque, demanda el conocimiento de la estructura atómica del blanco molecular obtenido por técnicas de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (NMR). Si la estructura del blanco no está disponible, es posible crear un modelo por homología a estructuras reportadas de proteínas relacionadas. Utilizando conocimientos de la química medicinal, luego se pueden llevar a cabo estudios con el fin de predecir y guiar el proceso de optimización de inhibidores con alta afinidad y selectividad por el sitio activo de la proteína en cuestión ([Mandal 2009](#)).

### **1.5.2 Estrategia de retroalimentación**

Claramente, es muy difícil que una campaña en busca de un nuevo candidato a fármaco sea abordada por un único laboratorio u organización/empresa. Para la gran cantidad de compuestos que se manejan es necesario un equipo de trabajo multidisciplinario y un plan sofisticado para administrar los tiempos y volúmenes de trabajo. Es indispensable contar con un equipo de químicos que diseñen y sinteticen los compuestos y que idealmente estudien sus parámetros de calidad (pureza) y solubilidad, bioquímicos que testeen los mismos contra el blanco postulado y contra otros blancos para descartar reactividad cruzada (especificidad) y también realizar ensayos de toxicidad, y farmacéuticos que hagan el seguimiento de los *hits* más prometedores hacia nuevas etapas de desarrollo. No se descarta el aporte en este proceso de bioinformáticos y biólogos estructurales para refinar las estructuras de ciertos ligandos o estudiar el mecanismo de acción de compuestos realizando simulaciones computacionales con datos de estructuras tridimensionales ([Yang 2006](#)).

Mediante todas estas colaboraciones se conecta la librería de compuestos con el cribado en formato HTS y el diseño racional de drogas, haciendo avanzar todo el proceso con mayor rapidez y consistencia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad inhibitoria contra la enzima tripanotión sintetasa y el crecimiento de la forma infectiva de *T. brucei* de una biblioteca de compuestos químicos.

### 2.2 Objetivos específicos

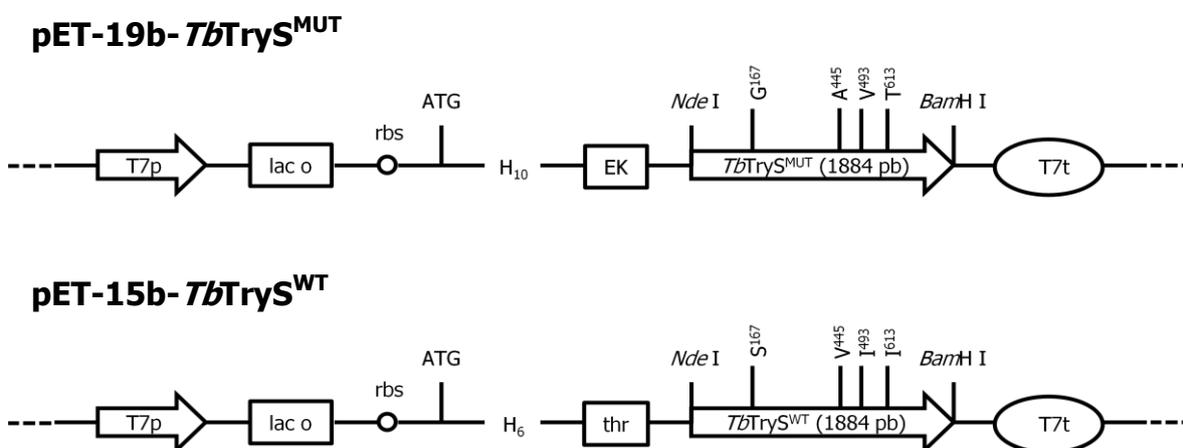
- Optimizar las condiciones de expresión, purificación y almacenamiento de la *TbTryS*.
- Optimizar ensayos enzimáticos en formato HTS para evaluar la actividad anti- *TbTryS* de compuestos de síntesis orgánica.
- Establecer un algoritmo de trabajo.
- Calcular la  $CI_{50}$  para los compuestos que presentan actividad moderada o alta.
- Evaluar la actividad biológica de la mayor cantidad posible de compuestos sobre cultivos de la forma infectiva de *T. brucei*.
- Calcular la  $CE_{50}$  de los mejores inhibidores encontrados.
- Implementar un sistema para el manejo de la información generada: planillas de cálculo y bases de datos.

# 3 MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 Biología molecular

### 3.1.1 Construcciones de ADN utilizadas

Los plásmidos utilizados para la expresión de la forma recombinante de la TryS de *T. brucei* fueron el vector pET-19b-*TbTryS*<sup>MUT</sup> (Comini 2003) y el pET-15b-*TbTryS*<sup>WT</sup> (Oza 2003). La Figura 7 muestra un esquema representativo de los elementos más importantes de dichos vectores y secuencias.



**Figura 7. Esquema de los vectores empleados para producir la *TbTryS* recombinante.** T7p: promotor de polimerasa de fago T7; lac o: operón de lactosa; rbs: secuencia de unión de ribosomas; ATG: codón de inicio de la transcripción/traducción; H<sub>10</sub> o H<sub>6</sub>: cola de 10 o 6 residuos de histidina; EK: sitio de corte de enterocinasa; thr: sitio de corte de trombina; *Nde* I y *Bam*H I: son los sitios de las enzimas de restricción empleadas para inserción de la secuencia de *TbTryS*; *TbTryS*<sup>MUT</sup> o *TbTryS*<sup>WT</sup>: secuencia codificante de la *TbTryS* correspondiente y tamaño molecular; T7t: secuencia terminadora de la transcripción. Sobre las secuencias de *TbTryS* se indican los residuos, y sus posiciones, que varían entre ambas secuencias.

A fines prácticos se denominará de ahora en adelante como *TbTryS*<sup>MUT</sup> a la enzima codificada por el plásmido pET-19b-*TbTryS* y *TbTryS*<sup>WT</sup> a la enzima codificada por el plásmido pET-15b-*TbTryS*. La secuencia de aminoácidos para *TbTryS*<sup>MUT</sup> y *TbTryS*<sup>WT</sup> difiere en las siguientes posiciones: G<sup>167</sup>S, A<sup>445</sup>V, V<sup>493</sup>I y T<sup>613</sup>I una de otra, respectivamente.

### 3.1.2 Preparación y transformación de células competentes

El ADN plasmídico empleado para transformar la cepa bacteriana de expresión de las proteínas recombinantes es preparado fresco a partir de las células MAX Efficiency® DH5a de Invitrogen™. Las células competentes se descongelan en hielo, mezclan y distribuyen en alícuotas de 100 µL en tubos previamente enfriados. A una de estas alícuotas se le agregan 2 µL del plásmido de interés y luego de incubar en hielo por 30 minutos se realiza un shock térmico en baño de agua a 42 °C durante 45 segundos sin agitar. Luego se deja reposar el tubo en hielo por 2 minutos y paso seguido se agregan 900 µL de medio SOC [2% p/v triptona (Sigma-Aldrich, 61044), 0,5% p/v extracto de levadura (Sigma-Aldrich, 92144), 10 mM NaCl (Sigma-Aldrich, S3014), 2,5 mM KCl (Sigma-Aldrich, P9541), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, M2670), 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, 63138), y 20 mM glucosa (Sigma-Aldrich, G8270)] a temperatura ambiente y se incuba en agitador a 37 °C y 225 rpm durante 1 hora. Finalmente, se centrifuga a 3000 g por 5 minutos a 25 °C, el sobrenadante se descarta por volcado, el pellet de células se resuspende en el volumen de medio remanente del volcado y la suspensión se esparce sobre placas de LB-agar-ampicilina [5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, 10 g de NaCl y 7 g de agar (Sigma-Aldrich, A7002) en un litro de agua destilada, 100 µg.mL<sup>-1</sup> ampicilina, pH 7,4]. Las placas se incuban a 37 °C toda la noche.

Bacterias *Escherichia coli* de la cepa Tuner™ (DE3) y BL21 (DE3) (Novagen®) se emplearon como hospederos para la expresión de las proteínas recombinantes. La preparación y transformación de las células competentes se realiza como se comenta a continuación: 10 µL de un *stock* de glicerol de la cepa de interés es inoculado en 5 mL de medio LB líquido (5 g de extracto de levadura, 10 g de triptona, y 10 g de NaCl en un litro de agua destilada, el pH se ajusta a un valor de 7,4 con 10 M NaOH) e incubado a 37 °C con agitación a 220 rpm durante toda la noche. Un mL de este cultivo es inoculado en 50 mL de medio LB contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se incuba a 37 °C y 220 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> = 0,4. El cultivo se transfiere, entre

mecheros, a un tubo BD Falcon™ estéril de 50 mL y se deja reposar 20 minutos en hielo. En adelante, es importante mantener las células frías durante todo el proceso; la suspensión celular se centrifuga a 3000 g y 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante se descarta y las células se resuspenden en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, C5670) 0,1 M frío con delicadeza. La suspensión se incuba 30 minutos en hielo, luego se centrifuga a 2500 g y 4 °C por 10 minutos y el pellet se resuspende en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío. A partir de esta suspensión celular se preparan alícuotas de 250 µL en tubos eppendorf™ mantenidos en hielo. Para la transformación se agregan hasta 10 µL del plásmido [pET-19b-*TbTryS* para las células *E. coli* Tuner™ (DE3) y pET-15b-*TbTryS* para las BL21 (DE3)], dependiendo de la concentración (las bacterias se transforman con ~ 500 ng de ADN plasmídico); la mezcla se incuba por 30 minutos en hielo y luego se realiza un shock térmico de 2 minutos exactos en baño de agua a 42 °C. Las células son colocadas inmediatamente en hielo, se les agrega 750 µL de medio LB y se incuban a 37 °C y 220 rpm por 50 minutos. Finalmente, el cultivo se centrifuga a 3000 g por 5 minutos a 25 °C, se descarta el sobrenadante, las células se resuspenden en el volumen restante y se distribuyen sobre placas de LB-agar-ampicilina. Las placas se incuban a 37 °C hasta el día siguiente.

### 3.1.3 Purificación de ADN plasmídico

Se realiza utilizando el GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, PLN350). El primer paso es centrifugar las células de un cultivo de 5 mL y descartar el sobrenadante. Seguido a eso se resuspende el pellet en 200 µL de solución de resuspensión empleando un vortex. A continuación se agregan 200 µL de solución de lisis, se mezcla por inversión suave y se deja reposar por 5 minutos mientras aclara. Para interrumpir la reacción de lisis se agregan 350 µL de la solución de neutralización, se mezcla por inversión y se centrifuga a 12000 g y 25 °C durante 10 min. En simultáneo se debe preparar la columna para la unión de ADN agregando 500 µL de la solución de preparación de columna y centrifugando 1 minuto a 12000 g. El sobrenadante del lisado centrifugado se vierte sobre la columna pre-equilibrada y se vuelve a centrifugar para permitir la unión del ADN a la matriz de la columna. La

columna se lava con la solución de lavado y luego se seca mediante una centrifugación breve. Para eluir se agregan 50  $\mu\text{L}$  de agua filtrada y autoclavada y se recupera el plásmido mediante centrifugación a 12000 g y 25 °C durante 1 min.

## 3.2 Expresión, purificación y análisis de proteínas recombinantes

### 3.2.1 Expresión heteróloga

Para expresar ambas *TbTryS* se procede a inocular 5 mL de LB-ampicilina ( $C_f$  Amp = 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en tubo BD Falcon™ de 15 mL con una colonia de las respectivas cepas de expresión transformadas recientemente (<1 semana). Este cultivo se incuba a 37 °C y 220 rpm por 6 - 8 horas, luego se diluye 1:10 en 45 mL de LB-ampicilina contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL el cual se incuba en las condiciones anteriores durante toda la noche. Al otro día, se inoculan 5 mL del pre-cultivo en 450 mL de medio TB [24 g de extracto de levadura, 12 g de triptona, y 4 mL de glicerol (Carlo Erba, 453752) en un litro de agua destilada], complementado con 50 mL de sales de potasio [6,27 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Sigma-Aldrich, P3786) y 1,16 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich, P0662) en  $\text{H}_2\text{O}$  destilada], 25 mL de glucosa 20% p/v ( $C_f$  = 1%) y 500  $\mu\text{L}$  de ampicilina (Sigma-Aldrich, A9518) *stock* 100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Los cultivos se dejan crecer a 37 °C y 220 rpm hasta una  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,8$  y luego se incuban a 4 °C durante media hora. Al cabo de este tiempo se inicia la inducción de la expresión con el agregado de 250  $\mu\text{L}$  de IPTG (Euromedex, EU0008-B) 1 M e incubando los cultivos a 20 °C y 180 rpm durante 5 horas. Paso seguido, se mide la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  y se centrifuga el cultivo a 4°C y 3000 g por 15 minutos (centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus Superspeed Centrifuge, Thermo Scientific™) en tubos previamente pesados e identificados para poder cuantificar el peso húmedo del pellet celular. Las bacterias son resuspendidas en *buffer A* [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich, 71496) 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0] empleando una relación de 5 mL de *buffer A* por cada gramo de pellet. A la suspensión celular se le agregan inhibidores de proteasas [PMSF (Sigma-Aldrich, P7626) 1 mM; TLCK 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; pepstatina 150 nM y cistatina 4 nM] y 30 mg de lisozima (Sigma-Aldrich, L6876) por cada

100 mL de *buffer* A. Luego de incubar 1 hora en hielo, la suspensión celular se sonica (Branson Sonifier Cell Disruptor 200V) 6 veces durante 30 segundos (amplitud 40%), con interrupciones de 30 segundos cada vez. Por último, el lisado celular se centrifuga 1 o 2 veces (dependiendo del volumen de muestra y la turbidez del sobrenadante) a 4 °C y 35000 g por 30 minutos (centrífuga Sorvall™ RC 6 Plus Superspeed Centrifuge, Thermo Scientific™) y antes de inyectar el lisado a la columna de purificación, se lo clarifica en un filtro de 0,7 µm (Millipore, USA).

### 3.2.2 Purificación

El primer paso para la purificación de ambas versiones de *TbTryS* consiste en una cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) en columna HisTrap™ FF de 1mL (GE Healthcare Life Sciences) aprovechando que las proteínas recombinantes poseen una cola de histidinas. Esta purificación se realiza a 4 - 8 °C manteniendo un flujo de 1 mL.min<sup>-1</sup> con una bomba peristáltica TRIS™ (Teledyne Isco). La columna de la IMAC se equilibra con 10 volúmenes de *buffer* A previo a cargar la muestra, y posteriormente, se lava con 10 volúmenes de *buffer* A + 25 mM de imidazol (Sigma-Aldrich, 56750). La elución se realiza inyectando 15 mL de *buffer* A + 500 mM de imidazol y colectando fracciones de aproximadamente 1 mL, las cuales se analizan por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como se describe en la sección 3.2.3.

Con el fin de obtener el máximo de pureza, las fracciones de la IMAC conteniendo TryS fueron sometidas a una cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) acoplada a un equipo de FPLC (ÄKTApurifier, GE Healthcare Life Sciences). La SEC se realizó en el *buffer* de ensayo de actividad enzimática, llamado "*buffer* de reacción" [10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM HEPES (Sigma-Aldrich, H3784) y 0,5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, ED2SS) pH 7,2], agregado de 150 mM NaCl (*buffer* de enzima). Las fracciones de la IMAC enriquecidas en TryS se concentran con un filtro Amicon® (Millipore, USA) de 2 mL con corte de 30 KDa a 4 °C y 4000 g. Se inyectan 500 µL de esta muestra en la columna de gel filtración pre-

equilibrada con *buffer* de reacción. La SEC se realiza a temperatura ambiente empleando un flujo constante de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. El perfil de elución se sigue midiendo la absorción a 280 nm y se colectan fracciones de 1 mL.

La *TbTryS*<sup>WT</sup> requiere de un paso adicional de separación que consiste en una cromatografía de intercambio iónico (IEC) en columna Mono Q<sup>TM</sup> HR 5/5 (GE Healthcare Life Sciences). Previo a la inyección en la columna se realiza un cambio de *buffer* en la muestra de proteína proveniente de la SEC. Para ello se emplea una columna PD-10 (Sephadex G-25, GE Healthcare Life Sciences) equilibrada en *buffer* de reacción. A esta columna se inyectan 2,5 mL del *pool* de fracciones de elución de la SEC. La fracción proteica se eluye de la columna agregando 3,5 mL de *buffer* de reacción. La muestra de *TbTryS*<sup>WT</sup> es luego inyectada en la columna Mono Q<sup>TM</sup> HR 5/5 pre-equilibrada en *buffer* de reacción. Luego se realiza un lavado con 5 mL de *buffer* de reacción y se procede a realizar una elución en modalidad de gradiente de fuerza iónica de 0 a 500 mM NaCl en *buffer* de reacción. La cromatografía se realiza a temperatura ambiente empleando un flujo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup> en un equipo de FPLC (ÄKTApurifier, GE Healthcare Life Sciences). El perfil de elución se sigue midiendo la absorción a 280 nm y se colectan fracciones de 1 mL.

Las proteínas son almacenadas a – 20 °C tal como eluyen de su último paso de purificación y con glicerol 40% v/v. Bajo estas condiciones no se observa pérdida significativa de actividad durante al menos 6 meses.

### 3.2.3 Electroforesis

Para analizar la presencia y nivel de pureza de las proteínas recombinantes se empleó el método de electroforesis en geles de poliacrilamida/bisacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los geles se preparan de la siguiente manera: 3,4 mL de H<sub>2</sub>O destilada; 4,0 mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% p/v (Sigma-Aldrich, A3574); 2,5 mL de *buffer* Tris-HCl (Sigma-Aldrich, T3253) 1,5 M, pH 8,8; 0,1 mL de SDS (Sigma-Aldrich, 62862) 10% p/v; 0,1 mL APS (Sigma-Aldrich, A3678) y 6 µL de TEMED (Sigma-Aldrich, T9281) para 10 mL del gel separador al 12% p/v acrilamida y 1,14 mL de H<sub>2</sub>O destilada; 340 µL de

acrilamida/bis-acrilamida 30% p/v; 0,5 mL de *buffer* Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 20  $\mu$ L de SDS 10% p/v; 20  $\mu$ L APS y 2  $\mu$ L de TEMED para 2 mL del gel concentrador o compactador al 4% p/v acrilamida. Estas cantidades permiten la preparación de dos geles. Se empleó el sistema de preparación de geles de Hoefer® Multiple Gel Caster (Amersham Pharmacia) y fuente de poder PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Bio-Rad). Las electroforesis se realizaron a 0,03 A en *buffer* Tris-base (Sigma-Aldrich, T6066) 0,25 M, glicina (Sigma-Aldrich, G7126) 0,52 M y SDS 35 mM, pH 8,3.

Para revelar el gel, se sumerge el mismo en azul de Coomassie [0,1% p/v brilliant blue R350, metanol 20% v/v y ácido acético (Sigma-Aldrich, 695084) 10% v/v] durante un par de horas y seguidamente se destiñe con una solución de etanol:agua 7:10 y ácido acético 10% v/v.

### **3.2.4 Determinación de la concentración**

La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA) (Sigma-Aldrich, B9643) usando seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, 05479) como estándar. El ensayo se realiza en placas de 96 pocillos (Costar 3590, Corning Inc.) donde se agregan 10  $\mu$ L por pocillo de la proteína en estudio, o de concentraciones conocidas de BSA para realizar la curva de calibración del ensayo. Existe un comportamiento lineal entre 0,25 y 1,5 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA. Luego se agregan 200  $\mu$ L de una mezcla de BCA y sulfato de cobre en relación 51:1 y se deja incubar 1 hora a 37 °C. La lectura se realiza midiendo la absorción a 570 nm de cada pocillo con el equipo Multiskan EX (Thermo Scientific) y los datos de concentración se intrapolan de la gráfica de Absorción vs. [BSA].

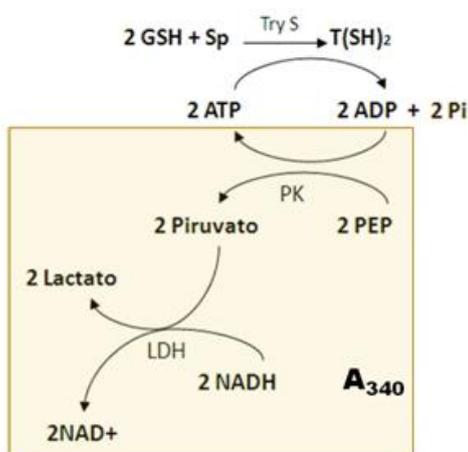
## **3.3 Ensayos de actividad tripanotión sintetasa**

### **3.3.1 Ensayo cinético**

Se utiliza para verificar que la enzima expresada y purificada tenga actividad. El principio de este ensayo cinético consiste en un sistema acoplado de enzimas (Figura 8) donde el trifosfato de adenosina (ATP) (Sigma-Aldrich, A2383)

consumido por TryS es regenerado por la piruvato quinasa (PK) (Sigma-Aldrich, P1506) a partir de difosfato de adenosina (ADP) y fosfoenolpiruvato (PEP) (Sigma-Aldrich, 860077) dando lugar a la formación de piruvato el cual es convertido en lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) (Sigma Aldrich, L2500) a expensas de la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH) (Sigma-Aldrich, N4505) a  $\text{NAD}^+$  lo cual es posible monitorear a  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .

A una mezcla que contiene NADH, LDH, PEP, PK, ditioneitol (DTT) (AppliChem, A1101), glutatión (GSH) (Sigma-Aldrich, G4251) y ATP disueltos en *buffer* de reacción, se le agregan 5  $\mu\text{L}$  de enzima y luego para comenzar la reacción, se agregan 17  $\mu\text{L}$  o 4  $\mu\text{L}$  de espermidina (SPD) (Sigma-Aldrich, 85558) según la enzima ( $Tb\text{TryS}^{\text{MUT}}$  o  $Tb\text{TryS}^{\text{WT}}$  respectivamente). La reacción se realiza en un volumen final de 150  $\mu\text{L}$  y las concentraciones finales de los reactivos se detallan a continuación: 0,2 mM NADH; 10  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  LDH; 2 mM PEP; 10  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  PK; 5 mM DTT; 12,6 mM y 100  $\mu\text{M}$  GSH para la  $Tb\text{TryS}^{\text{MUT}}$  y  $Tb\text{TryS}^{\text{WT}}$ , respectivamente; 2 mM y 120  $\mu\text{M}$  ATP para la  $Tb\text{TryS}^{\text{MUT}}$  y  $Tb\text{TryS}^{\text{WT}}$ , respectivamente; 20 mM y 1,2 mM SPD para la  $Tb\text{TryS}^{\text{MUT}}$  y  $Tb\text{TryS}^{\text{WT}}$ , respectivamente. Las reacciones se realizan en cubeta de cuarzo (QS 10.00 mm) y midiendo absorción a 340 nm en un espectrofotómetro Varian Cary® 50 UV-Vis (Agilent Technologies).



**Figura 8.** Ensayo cinético acoplado de actividad enzimática. Para seguir la actividad de la TryS (producción de ADP) se agrega PEP, NADH y las enzimas PK y LDH. La oxidación de NADH es detectada midiendo la caída en absorción a 340 nm.

### 3.3.2 Ensayo de punto final

Se mide la actividad enzimática mediante una reacción colorimétrica que detecta uno de los productos de la reacción, el fosfato inorgánico (Pi). La reacción emplea el reactivo comercial BML-AK111 BIOMOL Green™ (Enzo Life Sciences, UK) el cual es una modificación del clásico reactivo "verde de malaquita". El complejo coloreado que se forma en la reacción, tiene un máximo de absorción a ~650 nm.

El ensayo se realiza en placa de 96 pocillos (Costar 3590, Corning Inc.) (formato HTS) donde en cada uno de ellos se colocan 5 µL de compuesto disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T. Baker, 9224) o el propio disolvente en el caso del control, 40 µL de mezcla de reacción (MR) y 5 µL de enzima o *buffer* de la enzima en el blanco. La MR contiene todos los sustratos de la enzima – 300 µM y 50 µM GSH para la *TbTryS*<sup>MUT</sup> y la *TbTryS*<sup>WT</sup>, respectivamente, 2 mM SPD y 150 µM ATP – y DTT a una concentración de 5 mM, disueltos en el *buffer* de reacción. Las concentraciones de sustrato se ajustan teniendo en consideración las concentraciones intracelulares reportadas para cada uno de ellos en la forma infectiva de *T. brucei* (Krauth-Siegel 2008; Taylor 2008; Torrie 2009) y los parámetros cinéticos reportados (Oza 2003) y/o determinados en este trabajo para las enzimas en cuestión.

La reacción se inicia con el agregado de 5 µL de enzima ( $C_f = 150 - 250$  nM con una Actividad Específica =  $0,010 - 0,017$  nmol.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>) y luego de incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) la reacción se detiene con el agregado de 200 µL del reactivo BIOMOL Green™ el cual contiene ácido clorhídrico. El color se deja desarrollar durante 20 minutos y se realiza la lectura de absorción a 650 nm en el lector de microplacas Multiskan EX (Thermo Scientific).

Los resultados se expresan como actividad enzimática remanente (%) y se calculan cómo:  $[ ( A_{650nm} \text{ Comp}' / A_{650nm} \text{ Ctrl}' ) \times 100 ]$  donde  $A_{650nm} \text{ Comp}'$  representa la diferencia de absorción a 650 nm para el compuesto X en la mezcla de reacción con y sin enzima  $[ A_{650nm} \text{ Comp} - A_{650nm} \text{ BlancoComp} ]$ , y

$A_{650\text{nm}}$  Ctrl' es el valor de absorción a 650 nm del control de reacción corregido por el correspondiente blanco en ausencia de enzima, es decir: [  $A_{650\text{nm}}$  Ctrl -  $A_{650\text{nm}}$  BlancoCtrl ].

Para cada ensayo la concentración de enzima en la condición sin inhibidor se ajusta de forma que se genere una concentración de Pi  $\sim 20 \mu\text{M}$ , la cual se ubica en el rango lineal de Señal ( $A_{650 \text{ nm}}$ ) vs. Tiempo.

La interferencia de compuestos con el reactivo BIOMOL Green™ se evalúa en la mismas condiciones del ensayo de actividad de punto final excepto por la exclusión del agregado de enzima y la inclusión de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a una concentración final de  $20 \mu\text{M}$ .

### **3.4 Ensayos de actividad biológica *in vitro* contra parásitos**

#### **3.4.1 Cultivo de parásitos**

Se trabaja con la forma infectiva del parásito *Trypanosoma brucei brucei* cepa 427 línea celular 449 que fueron transfectados con un constructo que contiene una fusión del gen de la glutarredoxina humana 1 con el de la proteína verde fluorescente redox sensible (roGFP2) bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina (Sardi y Comini, no publicado). Las células se cultivan en medio HMI-9 completo (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen), suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS) libre de tetraciclina (PAA, A15-109); 3,02 g de  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma-Aldrich, S5761); 28,2  $\text{mg.L}^{-1}$  batocuproína (Sigma-Aldrich, B1125); 39  $\text{mg.L}^{-1}$  timidina (Sigma-Aldrich, T1895); 136  $\text{mg.L}^{-1}$  hipoxantina (Sigma-Aldrich, H9636); 182  $\text{mg.L}^{-1}$  L-cisteína (Sigma-Aldrich, C7880);  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, M3148)  $C_f = 0,2 \text{ mM}$ ; 10  $\text{U.mL}^{-1}$  penicilina/estreptomicina (Gibco); 0,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  fleomicina (Sigma-Aldrich, P9564) y 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  higromicina (Invitrogen, 10687010); y se incuban en condiciones aeróbicas y de atmósfera húmeda, a 37 °C en estufa gaseada con 5% de  $\text{CO}_2$ .

### 3.4.2 Ensayo semiautomatizado

El ensayo se realiza en placa de 96 pocillos (Costar 3599, Corning Inc.) donde en cada uno de ellos se colocan 2  $\mu\text{L}$  de compuesto disuelto en DMSO o el propio disolvente (en el caso del control) y 200  $\mu\text{L}$  de cultivo de parásitos a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  parásitos. $\text{mL}^{-1}$ . Este valor fue definido de manera tal que a las 24 horas la densidad celular alcance los  $2 \times 10^6$  parásitos. $\text{mL}^{-1}$  en los cultivos no tratados con compuestos.

Cuarenta y ocho horas antes del día del ensayo deben realizarse pasajes sucesivos del cultivo de parásitos de la siguiente manera: a tiempo 0 se prepara un cultivo con una densidad celular de  $0,5 \times 10^6$  parásitos. $\text{mL}^{-1}$  en 5 mL de medio HMI-9 completo contenidos en una botella de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  (#430168, Corning Inc.). A las 24 horas se realiza un recuento en cámara de Neubauer de dicho cultivo y se inocula 10 mL de medio HMI-9 completo de manera de alcanzar una densidad celular de  $0,5 \times 10^6$  parásitos. $\text{mL}^{-1}$  en botellas de cultivo de 25  $\text{cm}^2$ .

El día del ensayo los parásitos del pre-cultivo a una densidad de  $\sim 2 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$  (fase exponencial media) son contados en cámara de Neubauer y cosechados por centrifugación a 25  $^{\circ}\text{C}$  y 2000 g por 10 minutos. El pellet celular se resuspende en medio de cultivo HMI-9 completo y fresco a una densidad de  $0,5 \times 10^6$  parásitos. $\text{mL}^{-1}$ . Se induce dicha suspensión con tetraciclina (Sigma-Aldrich, T7660) 5  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (excepto 1 mL de la misma, que se utiliza como control negativo de inducción) y luego se agregan 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión inducida por pocillo en la placa de cultivo según corresponda. Las soluciones *stock* de los compuestos se preparan a 24 mM en DMSO (en la medida que la solubilidad del compuesto lo permita; en caso contrario se diluye al medio hasta que disuelva), se realizan las diluciones seriadas correspondientes a las concentraciones que se van a evaluar, e inmediatamente se distribuyen en los pocillos (2  $\mu\text{L}$  por pocillo)<sup>2</sup>. La placa se incuba durante 24

---

<sup>2</sup> El agregado de los compuestos a la placa antecede al de la suspensión celular.

horas en condiciones aeróbicas y de atmósfera húmeda, a 37 °C en estufa gaseada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se trabaja por triplicado para cada una de las concentraciones evaluadas, incluyendo los controles.

Transcurridas las 24 horas de incubación, se evalúa la actividad anti-proliferativa mediante recuento por citometría de flujo con el equipo CyAn™ ADP Analyzer (Dako Cytomation) trabajando a flujo constante (Preset: 20500, que corresponde a 800 - 1200 eventos por segundo) y tiempo constante (1 minuto por muestra). Al momento de adquirir las muestras, éstas se diluyen al tercio (100 µL:200 µL) en *buffer* PBS 1X - glucosa 1% p/v y se agregan 2 µL de yoduro de propidio 200 µg.mL<sup>-1</sup> (un agente intercalante de ácidos nucleicos no permeable) que se utiliza como marcador de integridad de membrana y por lo tanto de viabilidad celular.

Las muestras son excitadas con un laser de 488 nm y los parámetros de adquisición se especifican en la Tabla 1.

Nombre	Voltaje	Ganancia
FSC	N/A	1.0
SSC	400	1.0
Filtro 530/40 nm	999	12.0
Filtro 613/20 nm	670	1.0

**Tabla 1. Parámetros de voltaje y ganancia de los láseres y detectores del equipo CyAn.** El corte está puesto en el FSC con un umbral (o *threshold*) de 0,23%. Todos los detectores registran "*Peak/Area/Log*" y en ninguno de los casos hay compensación. N/A = no aplica.

Las células (eventos) se discriminan de acuerdo al patrón de dispersión frontal de luz ("*forward-scatter*") visualizado en un gráfico de puntos "*forward-scatter*" en función de la granulosidad de la muestra ("*side-scatter*") ambos en escala logarítmica, mientras que la fluorescencia de GFP y de yoduro de propidio se detecta a  $\lambda_{em} = 530/40$  en escala lineal y a  $\lambda_{em} = 613/20$  en escala logarítmica, respectivamente.

Los datos son procesados con el programa Summit v4.3 (Dako Colorado, Inc) y el análisis de los mismos se realiza en *batch* con el software FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Inc.). Se calcula el porcentaje de parásitos viables respecto al control de la siguiente manera: [(número de parásitos para el compuesto X a la concentración Y) / (número de parásitos en el control de proliferación)] x 100 y

de ser necesario se determinan las  $CE_{50}$  obtenidas a partir de curvas dosis-respuesta ajustadas a la ecuación de la sigmoide de Boltzmann.

Los errores se calculan empleando propagación de errores y se expresan como 2 veces la desviación estándar muestral corregida ( $2s$ ) siendo:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

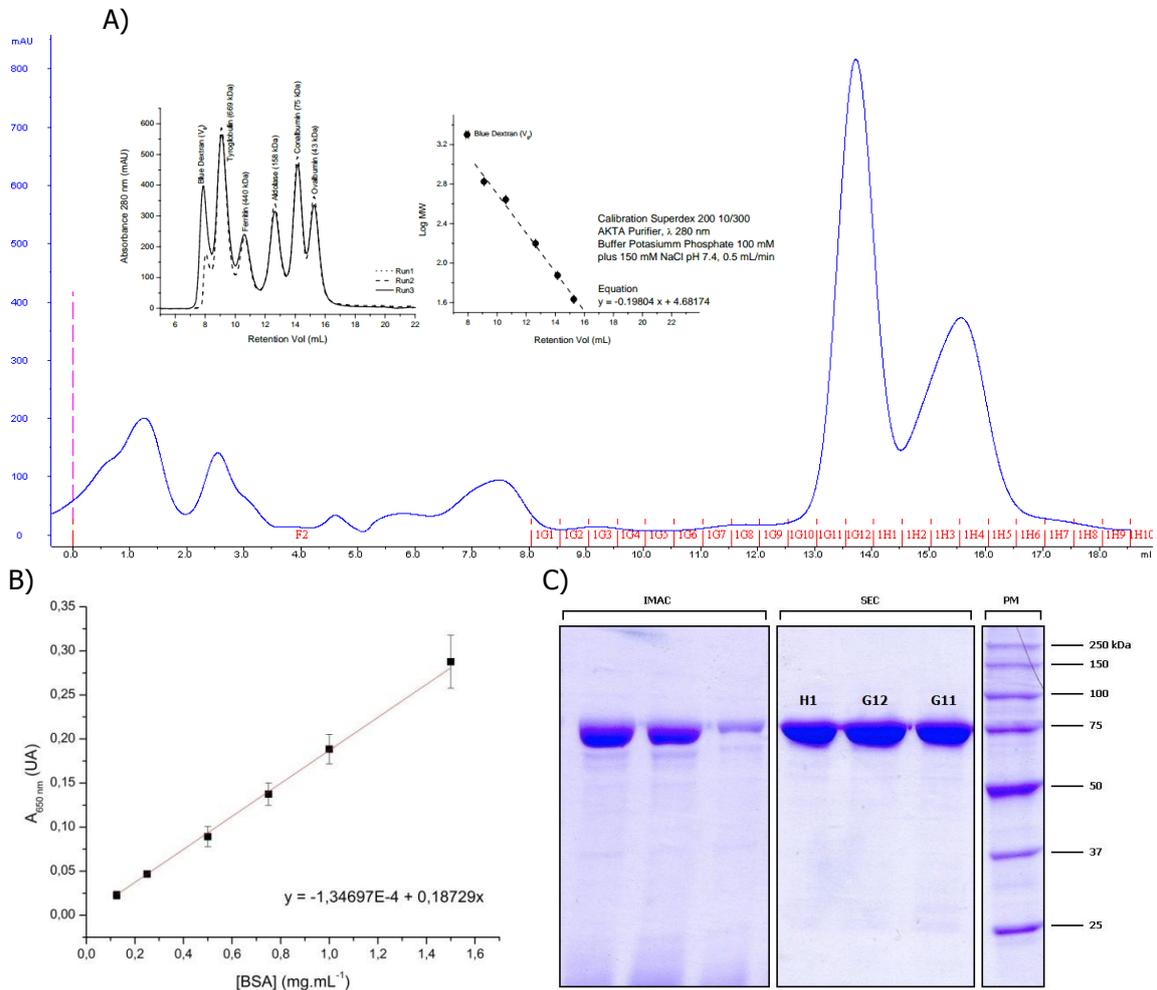
## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Producción y caracterización de las *TbTryS*

#### 4.1.1 Expresión y purificación de las enzimas

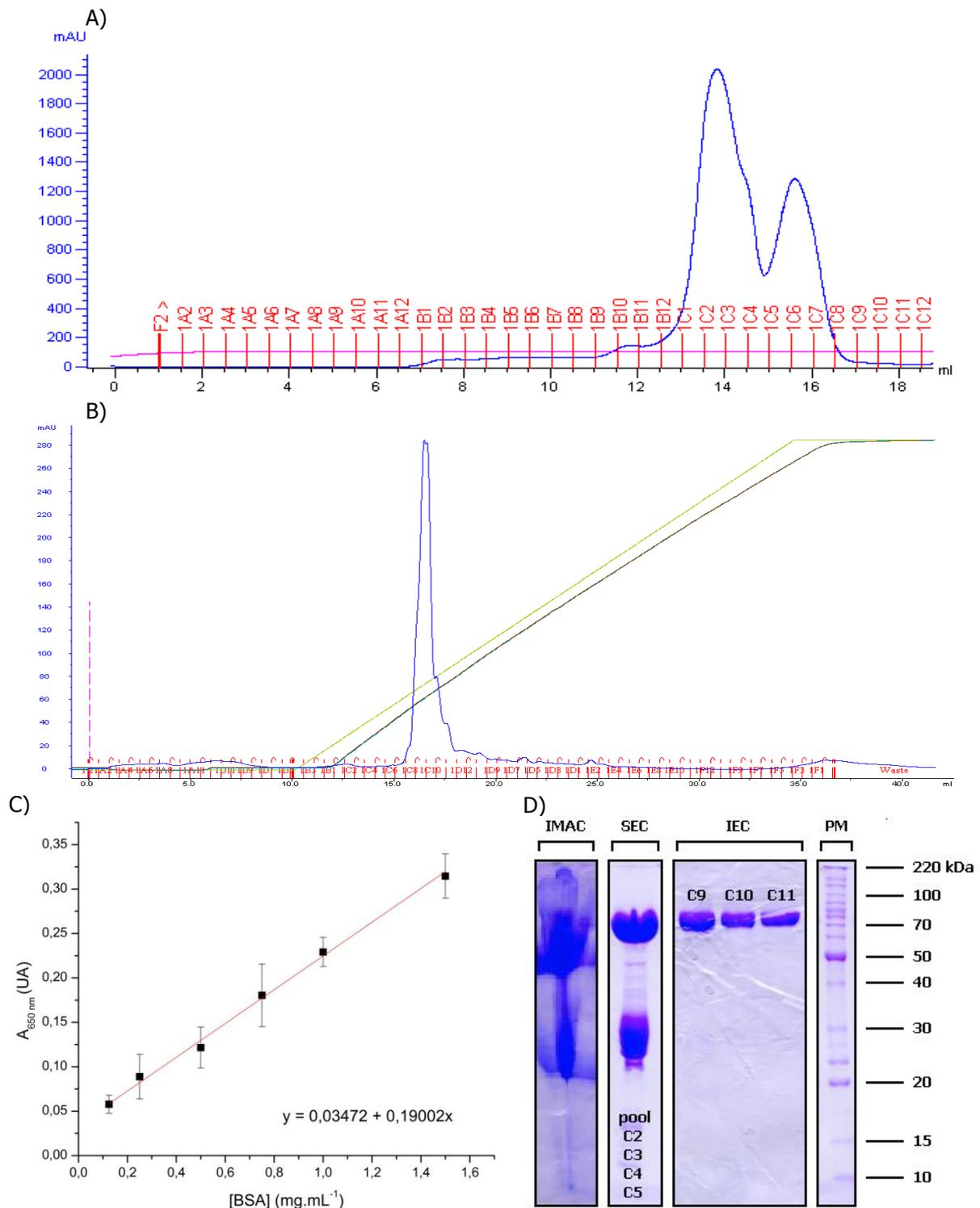
En esta sección y las secciones siguientes se presentarán los resultados obtenidos en este trabajo intentando respetar el orden cronológico de los mismos, no obstante antes de proseguir, es pertinente realizar algunas aclaraciones. En principio se comenzó estudiando la *TbTryS* codificada por el gen aislado y amplificado por Comini y col. 2003, la cual luego de su caracterización cinética demostró no ser inhibida por GSH ( $K_i^* > 12,6$  mM, ver sección 4.1.2) lo cual llevó a pensar que podría tener alguna modificación en su secuencia o estructura respecto a la *TbTryS* reportada por otros autores que sí era inhibida por GSH ( $K_i = 95$   $\mu$ M; Oza 2003). Con el fin de resolver estas discrepancias y verificar que las mismas no tengan una base técnica/metodológica, se decidió llevar a cabo la caracterización enzimática de ambas secuencias de *TbTryS* en las condiciones implementadas en nuestro laboratorio. A fines prácticos se denominó la *TbTryS* de Comini y col. 2003 como *TbTryS*<sup>MUT</sup> y la *TbTryS* de Oza y col. 2003 como *TbTryS*<sup>WT</sup>. El plásmido que expresa la *TbTryS*<sup>WT</sup> fue gentilmente cedido por el Profesor Alan Fairlamb de la Universidad de Dundee, Escocia. Las diferencias en el comportamiento cinético de ambas son analizadas en la sección 4.3.2.

La *TbTryS*<sup>MUT</sup> se obtuvo luego de 2 pasos de purificación (IMAC y SEC) con un rendimiento de ~ 1,5 mg de enzima por litro de medio de cultivo y una pureza final superior al 95% (Figura 9).



**Figura 9. A) Perfil de elución de la *TbTryS*<sup>MUT</sup> en una SEC.** La proteína recombinante eluye a los 13,7 mL, lo cual se corresponde con una masa molecular de aproximadamente 93 kDa según la curva de calibración de esta columna, que se muestra como insertos. El pico con un volumen de retención de 15,6 mL corresponde a un contaminante de aproximadamente 25 kDa. **B) Ensayo del BCA para determinar cantidad de proteína.** Se realiza una curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA y se grafica contra la absorción a 570 nm. Se obtiene el dato de concentración de la pendiente de esta gráfica y corrigiendo por el factor de dilución. **C) Análisis por SDS-PAGE de los pasos de purificación de la *TbTryS*<sup>MUT</sup>.** En cada carril de la SEC se siembran 10 µg de proteína. La enzima migra con un peso molecular correspondiente a 75 kDa y no se observa contaminación con otras proteínas.

La *TbTryS*<sup>WT</sup> se obtuvo luego de 3 pasos de purificación (IMAC, SEC y IEC) con un rendimiento de 2,6 mg de proteína por litro de medio de cultivo y una pureza final superior al 95% (Figura 10).



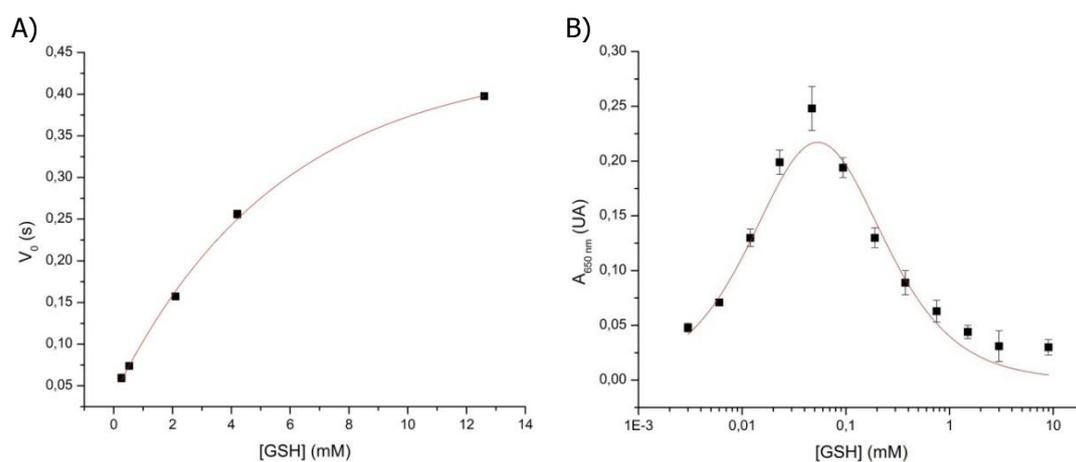
**Figura 10. A) Perfil de elución de la *TbtTryS*<sup>WT</sup> en una SEC.** La proteína recombinante eluye a los 13,8 mL, lo cual se corresponde con una masa molecular de aproximadamente 88,9 kDa según la curva de calibración de esta columna, que se muestra como insertos en la Figura 9 A). El pico con un volumen de retención de 15,6 mL corresponde a un contaminante de aproximadamente 25 kDa. **B) Perfil de elución de la *TbtTryS*<sup>WT</sup> en una IEC.** La *TbtTryS*<sup>WT</sup> recombinante eluye a una concentración de aprox. 150 mM NaCl. **C) Ensayo del BCA para determinar cantidad de proteína.** Se realiza una curva de calibración con concentraciones conocidas de BSA y se grafica contra la absorción a 570 nm. Se obtiene el dato de concentración de la ecuación de la recta y corrigiendo por el factor de dilución. **D) Análisis por SDS-PAGE de los pasos de purificación de la *TbtTryS*<sup>WT</sup>.** En los sucesivos pasos

cromatográficos (IMAC: cromatografía de afinidad por metales, SEC: gel filtración y IEC: intercambio iónico) se logra incrementar la pureza hasta llegar a un producto final con un peso molecular de 75 kDa y pureza  $\geq 95\%$ . Por carril se sembraron 10  $\mu\text{g}$  de proteína.

Las proteínas recombinantes presentaron perfiles de elución en solución y de migración en condiciones desnaturalizantes que fueron totalmente compatibles con la presencia de una especie homogénea y monomérica de la *TbTryS* en sus versiones WT y MUT. Las proteínas se almacenaron en las siguientes condiciones: [*TbTryS*]  $\sim 1,5 \mu\text{M}$  en *buffer* de reacción con 40% v/v glicerol y a  $-20^\circ\text{C}$ . Bajo estas condiciones las enzimas se mantuvieron activas (60-65 % respecto a tiempo 0) durante al menos 10 meses.

#### 4.1.2 Determinación de parámetros cinéticos

Para calcular la  $K_m^3$  y  $K_i$  para GSH de la *TbTryS*<sup>MUT</sup> se emplea el ensayo cinético de actividad. Se comienza la reacción con el agregado de GSH variando su concentración final de 0,26 a 12,6 mM y se trabaja a una [*TbTryS*<sup>MUT</sup>] de 2  $\mu\text{M}$ . La  $K_m$  calculada es de 2,85 mM y la  $K_i^* > 12,6 \text{ mM}$  (Figura 11A). Para la *TbTryS*<sup>WT</sup> se emplea el ensayo de actividad de punto final. Se comienza la reacción con el agregado de GSH variando su concentración de 0,3  $\mu\text{M}$  a 9 mM y se trabaja a una [*TbTryS*<sup>WT</sup>] de 250 nM. La  $K_m^*$  calculada para esta enzima es de 30  $\mu\text{M}$  y la  $K_i$  de 95  $\mu\text{M}$  (Figura 11B).

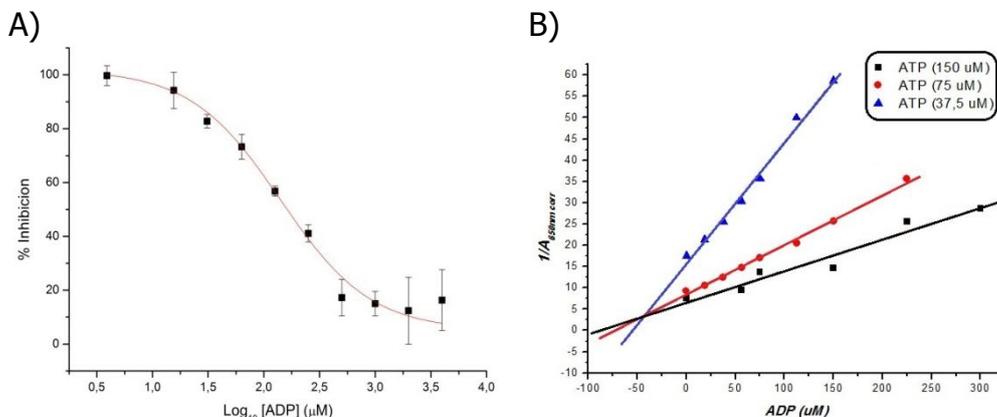


**Figura 11. A) Gráfico de  $V_0$  vs. [GSH] para la *TbTryS*<sup>MUT</sup>. B) Gráfico de  $A_{650}$  vs. [GSH] para la *TbTryS*<sup>WT</sup>.** A partir de estos gráficos se calculan los parámetros cinéticos para GSH de las dos enzimas. Cabe aclarar que todos los valores de  $A_{650}$  de B) corresponden a reacciones que transcurrieron por un tiempo fijo de 15 minutos.

<sup>3</sup> Se define  $K_m$  como la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima y  $K_i$  como la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor.  $K_m^*$  y  $K_i^*$  son las constantes cinéticas aparentes.

La gran diferencia observada en los valores de  $K_m$  para GSH en ambas enzimas puede estar dada por la diferencia de 4 residuos aminoacídicos que éstas presentan entre sí, de los cuales alguno está afectando la interacción con el sustrato. En particular en la posición 613  $TbTryS^{MUT}$  presenta un residuo de treonina (aminoácido polar) que reemplaza a una isoleucina (aminoácido hidrofóbico no polar) en la misma posición de la  $TbTryS^{WT}$ . Resulta interesante destacar que estudios de modelado molecular sobre la estructura de la TryS de *Leishmania major* (Koch 2013) y nuestro propio análisis de las estructuras de *E. coli* GspS (Pai 2011) y *LmTryS* (Fyfe 2008) señalaron que la Ile<sup>613</sup>, a pesar de no estar en contacto con el sustrato ni adyacente a este, forma parte de una extensa red de contactos hidrofóbicos que contribuyen a estabilizar al sitio de unión de GSH.

Para calcular la  $K_i^*$  para ADP de ambas enzimas, se emplea el ensayo de actividad de punto final y se aplica la ecuación de Cheng-Prusoff  $K_i = CI_{50} / ([S]/K_m + 1)$ . En una primera instancia, se asume que el mecanismo de inhibición es competitivo con ATP. Se realizan ensayos a concentración de ATP fija (igual al ensayo original) mientras se varía la de ADP en diluciones seriadas al medio en el rango 1 mM - 40  $\mu$ M. Luego se realizan ensayos a una concentración de ADP =  $CI_{50}$  mientras se varía la concentración de ATP entre 1 mM y 40  $\mu$ M. De esta manera se confirma el mecanismo de inhibición competitivo por producto y se obtiene la  $K_i^*$  ADP que resultó ser de  $162 \pm 7 \mu$ M para la  $TbTryS^{MUT}$  y de  $\sim 40 \mu$ M para la  $TbTryS^{WT}$  (Figura 12).



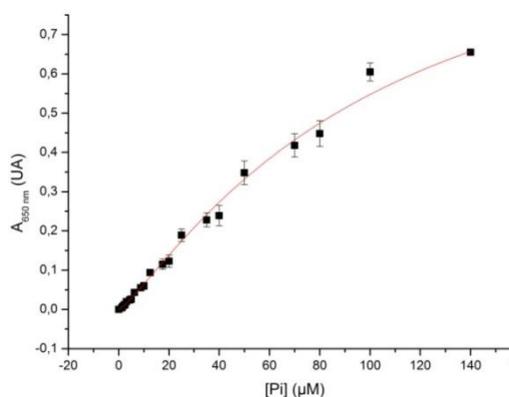
**Figura 12. A) Gráfico de % Inhibición actividad TryS vs.  $\text{Log}_{10}$  [ADP] para la  $TbTryS^{MUT}$ . B) Gráfico de  $1/A_{650}$  vs. [ADP] para la  $TbTryS^{WT}$ . A partir de estos gráficos se calcula la  $K_i^*$  para ADP para ambas enzimas.**

Los datos obtenidos de esta caracterización cinética resultaron importantes para realizar los ajustes correspondientes en distintos parámetros (concentración de sustrato y tiempo de reacción = acumulación de productos) del ensayo de cribado de compuestos contra *TbTryS*. No menor, esta caracterización nos permitió estimar el rol regulatorio sobre la actividad de TryS que podrían ejercer GSH y ADP a nivel fisiológico, y la relevancia del residuo hidrofóbico en la posición 613 para influenciar la interacción con el sustrato tiólico (GSH).

## 4.2 Ensayo de actividad de punto final

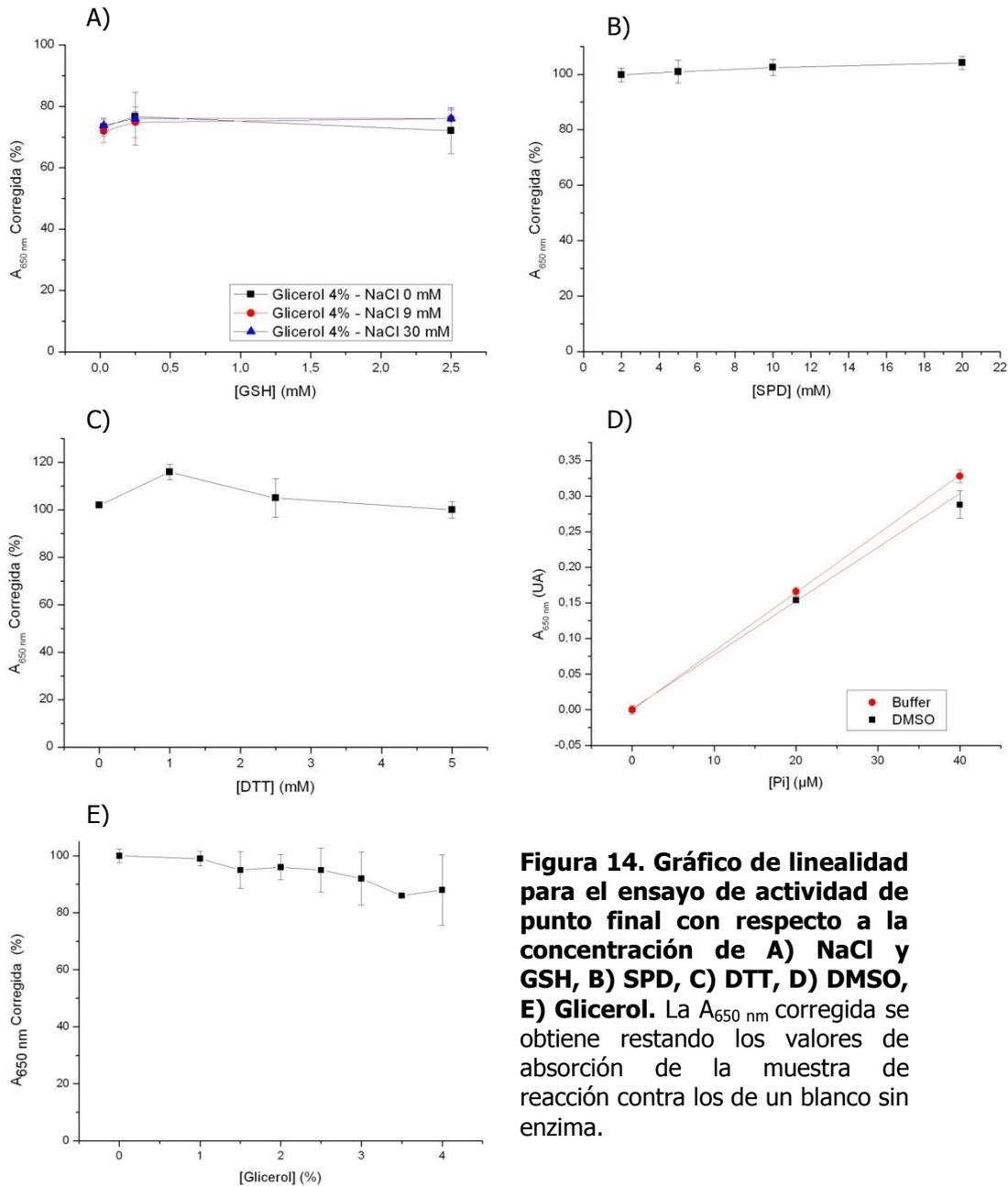
### 4.2.1 Puesta a punto

Se optimiza el tiempo del ensayo a 15 minutos y una actividad enzimática específica entre 0,010 – 0,017 nmol.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> (tanto de *TbTryS*<sup>MUT</sup> como *TbTryS*<sup>WT</sup>) para que la concentración de fosfato inorgánico (Pi) liberado sea 20 μM. En estas condiciones se mantiene la linealidad entre Absorbancia a 650 nm y [Pi] (Figura 13).



**Figura 13. Gráfico de linealidad para el ensayo de actividad de punto final con respecto a la concentración de fosfato liberado.**

También se evalúa la posible interferencia de todos los componentes que participan en la reacción (NaCl, DMSO, Glicerol, SPD, GSH, DTT) con el reactivo BIOMOL Green<sup>TM</sup>. Mientras que NaCl, SPD, GSH y DTT no afectan significativamente la absorción a 650 nm del reactivo BIOMOL Green<sup>TM</sup> a las concentraciones utilizadas en el ensayo (150 mM, 2 mM, 0,3 mM y 5 mM respectivamente) (Figura 14 A-C) el aumento en un 4% de la concentración de DMSO y Glicerol disminuye aproximadamente un 10% la sensibilidad del ensayo (Figura 14 D-E).



**Figura 14. Gráfico de linealidad para el ensayo de actividad de punto final con respecto a la concentración de A) NaCl y GSH, B) SPD, C) DTT, D) DMSO, E) Glicerol.** La  $A_{650\text{ nm}}$  corregida se obtiene restando los valores de absorción de la muestra de reacción contra los de un blanco sin enzima.

Como control de calidad de los ensayos, se usa el factor  $Z'$  (Zhang 1999) definido como  $Z' = 1 - [3 (\sigma_p + \sigma_n) / |\mu_p - \mu_n|]$  (donde  $\mu$  y  $\sigma$  corresponden al promedio y desviación estándar, respectivamente, del control positivo, p, y el control negativo, n) y el coeficiente señal/ruido. Para considerar el ensayo satisfactorio desde el punto de vista estadístico y técnico ambos parámetros deben presentar valores  $> 0,85$  y  $\sim 2,5$ , respectivamente. En casi la totalidad de los ensayos realizados se obtuvieron valores conforme a estos parámetros ( $Z' > 0,85$  y valores promedio de 0,3 UA y 0,08 UA para señal y ruido,

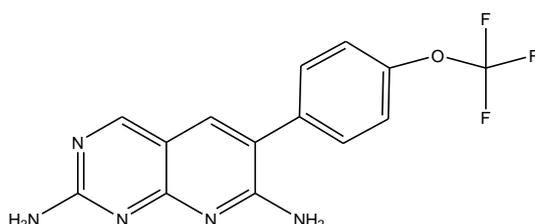
respectivamente, para 20  $\mu\text{M}$  de Pi) y de no ser así, el ensayo se repitió hasta cumplir con los criterios establecidos.

En cada ensayo se evaluaron 10 compuestos por placa (Figura 15) a una concentración de 30  $\mu\text{M}$ , por cuadruplicado, incluyendo un control de actividad de la enzima (con DMSO), un control de inhibición de la enzima y blancos para cada uno de los compuestos a evaluar.

						Blancos sin enzima						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>
<b>B</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>
<b>C</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>
<b>D</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>	<b>C+</b>	<b>C2</b>	<b>C4</b>	<b>C6</b>	<b>C8</b>	<b>C10</b>
<b>E</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>
<b>F</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>
<b>G</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>
<b>H</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>	<b>C1</b>	<b>C3</b>	<b>C5</b>	<b>C7</b>	<b>C9</b>	<b>C-</b>

**Figura 15. Esquema de organización de la microplaca de 96 pocillos para el ensayo de actividad de punto final.** C+ es el control positivo (de actividad de la enzima), C- es el control negativo (de inhibición de la enzima), C1 a C10 son los compuestos a evaluar con enzima (columnas 1 a 6) o sin enzima (blancos, columnas 7 a 12).

El compuesto utilizado como control de inhibición de la *TbTryS*<sup>MUT</sup> surgió en las primeras rondas de cribado de la quimioteca y es el ZVR 165 (Figura 16) que presentó una  $\text{CI}_{50}$  de 30  $\mu\text{M}$ . Como control de inhibición de la *TbTryS*<sup>WT</sup> se utilizó GSH a 9 mM.



**Figura 16. Estructura del compuesto ZVR 165.** Este compuesto fue proporcionado por Lucija Peterlin Masic de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Ljubljana en Ljubljana, Eslovenia.

#### 4.2.2 Algoritmo de trabajo

Se estableció un método sistemático de trabajo (Figura 17) que consiste en primera instancia en testear los compuestos con el ensayo de actividad enzimática de punto final a una concentración fija de 30  $\mu\text{M}$  y, en caso limiten la producción de Pi a niveles  $\leq 50\%$  respecto del control, proceder a confirmar

que éste sea un efecto inhibitor específico sobre la enzima y no una interferencia con el reactivo BIOMOL Green™. Una vez confirmada la actividad anti- *TbTryS* del compuesto, se procede a determinar la  $CI_{50}$  a partir de ensayos de actividad a distintas concentraciones del compuesto (curva dosis respuesta).

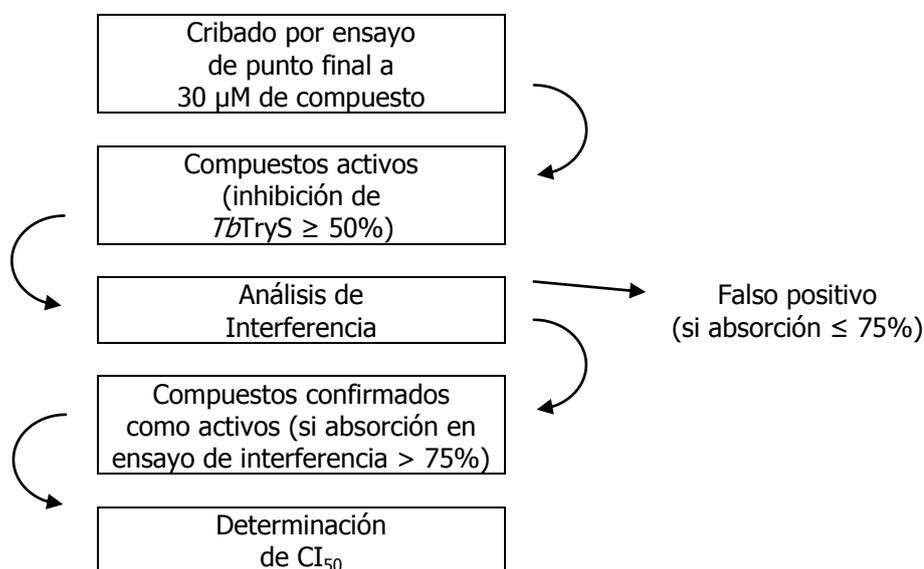


Figura 17. Esquema de trabajo para la identificación de inhibidores de TryS.

## 4.3 *Screening* primario de compuestos

### 4.3.1 Identificación de *hits* y determinación de $CI_{50}$

Se testearon más de 200 compuestos de nuestra propia quimioteca conformada por compuestos donados por nuestros colaboradores, algunos de los cuales han sido diseñados específicamente para actuar contra la enzima TryS (ZVR, ZEA, AD, ADMRC, ADKPN, KuRK y KuMai), y otros con potencial actividad antimicrobiana que fueron igualmente evaluados contra la TryS y la forma infectiva del parásito.

Los resultados para la totalidad de los compuestos evaluados, se encuentran en el Anexo 1. En la Tabla 2 se muestran sólo aquellos que tienen moderada y alta actividad inhibitoria (>50% inhibición a 30 µM) contra alguna de las *TbTryS* y un representante de cada familia de compuestos que no inhibieron a la enzima.

**Tabla 2. Actividad inhibitoria frente a *TbTryS* de algunos compuestos evaluados.** Se muestran todos los compuestos con una actividad inhibitoria > 50% frente a una u otra enzima y alguno representativo de cada serie de compuestos que no inhibieron a ninguna de las *TbTryS*. La nomenclatura abreviada para los núcleos estructurales es la siguiente: **ND**, información no disponible; **DAB**, derivado de una diamina N,N'-bis(bencil)-sustituida; **AI**, derivado de 4,5-dihidroazepino[4,5-b]indol-2(1H,3H,6H)-ona; **AI (P)**, significa que es una paulona y **AI (AZ)** que es una azapaulona; **SL**, derivado de una lactona de sesquiterpeno; **APPDA**, derivado de 6-arilpirido[2,3-d]pirimidin-2,7-diamina; **AOCA**, derivado de 2-aminoxazol-5-carboxamida; **BBHPP**, derivado de 1-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-benzoil-3-hidroxi-5-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona; **TP**, derivado de tieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona; **BF**, derivado de benzo[c][1,2,5]oxadiazol N-óxido o benzofuroxano.

Compuesto	Datos Estructurales	% Actividad Enzimática Remanente a 30 $\mu$ M / $CI_{50}$ ( $\mu$ M)	
		<i>TbTryS</i> <sup>MUT</sup>	<i>TbTryS</i> <sup>WT</sup>
ASP 11	ND	92,2 $\pm$ 2,5 / --	--
GAT 1075	ND	96,9 $\pm$ 1,9 / --	--
56	ND	81,3 $\pm$ 2,1 / --	--
SPBISOXA2	ND	99,5 $\pm$ 7,3 / --	--
APC 1-89	DAB	88,6 $\pm$ 2,6 / -- <sup>†</sup>	49,1 $\pm$ 1,5 / -- <sup>†</sup>
APC 1-101	DAB	82,1 $\pm$ 5,6 / -- <sup>†</sup>	38,8 $\pm$ 1,8 / -- <sup>†</sup>
APC 1-111	DAB	77,3 $\pm$ 5,7 / -- <sup>†</sup>	44,4 $\pm$ 3,2 / -- <sup>†</sup>
EAP 1-69	DAB	78,9 $\pm$ 5,2 / -- <sup>†</sup>	81,4 $\pm$ 5,6 / -- <sup>†</sup>
Mol 2008	AI (P)	41,0 $\pm$ 6,0 / -- <sup>†</sup>	-- / ~ 30 <sup>†</sup>
Schmidt 2	SL	101,2 $\pm$ 5,9 / --	--
KuRK 221	AI (P)	--	45,2 $\pm$ 4,1 / -- <sup>†</sup>
KuRK 268	AI (P)	--	47,6 $\pm$ 7,0 / -- <sup>†</sup>
KuMai 056	AI (AZ)	89,0 $\pm$ 4,8 / --	99,1 $\pm$ 2,3 / --
ZEA 3	APPDA	-- / 4,3 $\pm$ 2,9 <sup>†</sup>	85,5 $\pm$ 2,9 / --
ZEA 5	APPDA	-- / 4,4 $\pm$ 0,7 <sup>†</sup>	99,1 $\pm$ 5,0 / --
ZEA 8	APPDA	-- / 22,1 $\pm$ 4,9 <sup>†</sup>	77,3 $\pm$ 3,1 / --
ZVR 100 <sup>4</sup>	APPDA	10,0 $\pm$ 2,2 / -- <sup>†</sup>	77,3 $\pm$ 4,8 / --
ZVR 105 <sup>4</sup>	APPDA	46,0 $\pm$ 4,5 / -- <sup>†</sup>	90,5 $\pm$ 4,5 / --
ZVR 107	APPDA	-- / 5,2 $\pm$ 0,5 <sup>†</sup>	88,9 $\pm$ 5,0 / --
ZVR 108	APPDA	32,1 $\pm$ 3,4 / -- <sup>†</sup>	118,4 $\pm$ 8,0 / -- <sup>‡</sup>
ZVR 113 <sup>4</sup>	AOCA	48,6 $\pm$ 3,5 / -- <sup>†</sup>	99,6 $\pm$ 6,2 / --
ZVR 140	APPDA	-- / 3,7 $\pm$ 0,5 <sup>†</sup>	78,4 $\pm$ 5,6 / --
ZVR 150	APPDA	33,1 $\pm$ 4,1 / -- <sup>†</sup>	84,7 $\pm$ 5,4 / --
ZVR 157	APPDA	-- / 7,5 $\pm$ 1,2 <sup>†</sup>	80,6 $\pm$ 6,0 / --
ZVR 160	APPDA	34,6 $\pm$ 2,4 / -- <sup>†</sup>	79,2 $\pm$ 2,5 / --
ZVR 165	APPDA	24,6 $\pm$ 9,5 / -- <sup>‡</sup>	66,6 $\pm$ 4,0 / --
AD 81	BBHPP	-- / 9,0 $\pm$ 1,5 <sup>†</sup>	128,2 $\pm$ 3,6 / -- <sup>†</sup>
AD 84	BBHPP	-- / 4,1 $\pm$ 0,8 <sup>†</sup>	119,0 $\pm$ 6,3 / -- <sup>†</sup>
ADMRC 150 <sup>4</sup>	BBHPP	5,4 $\pm$ 1,3 / -- <sup>‡</sup>	101,4 $\pm$ 8,2 / --

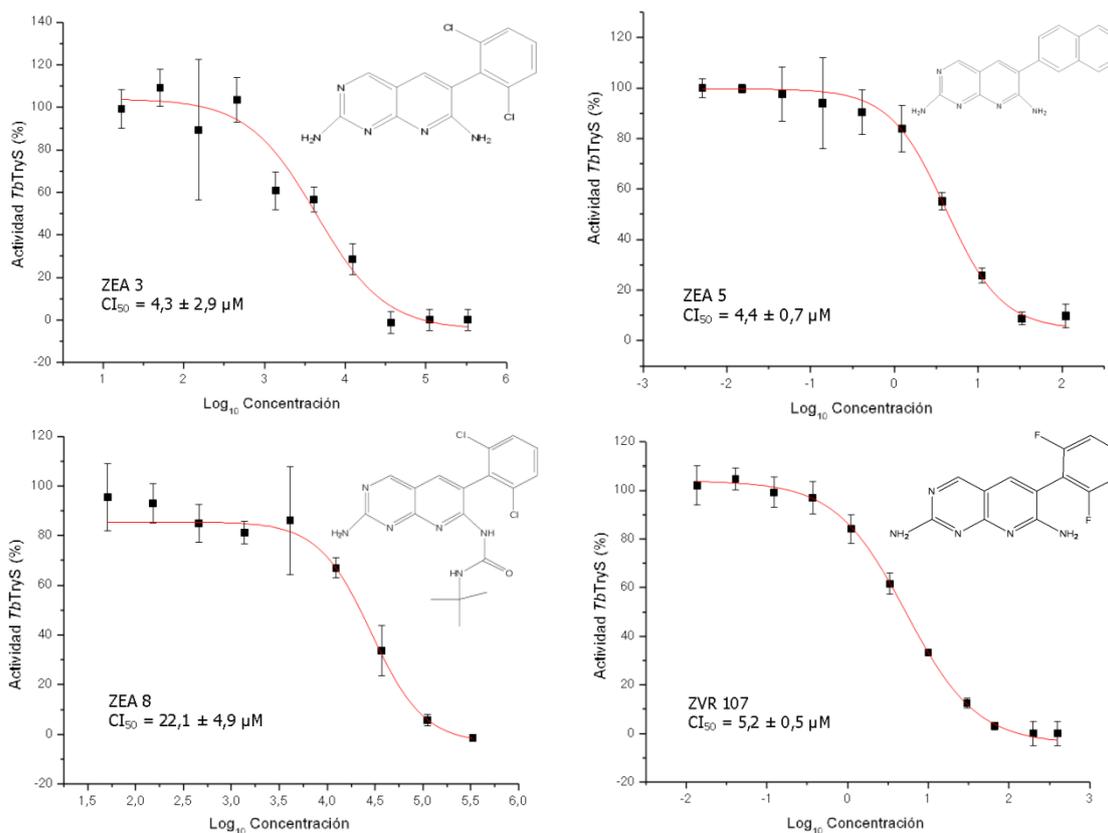
<sup>4</sup> Para estos compuestos no se sigue el algoritmo de trabajo planteado ya que no se consideró relevante profundizar el análisis de los mismos al no mostrar una fuerte inhibición contra ambas *TbTryS*.

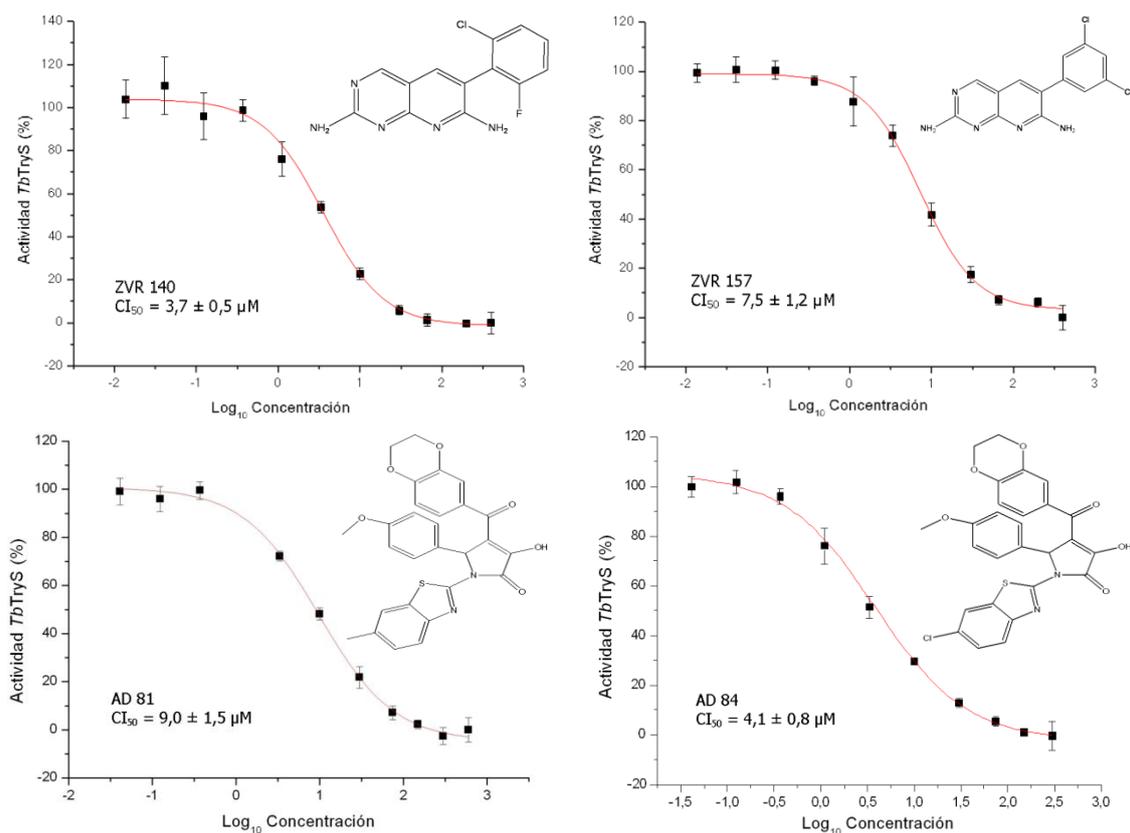
ADMRC 154 <sup>4</sup>	BBHPP	9,3 ± 1,5 / -- ‡	110,3 ± 8,7 / --
ADMRC 158	BBHPP	36,3 ± 3,5 / -- ‡	119,1 ± 4,6 / -- †
ADKPN 160	BBHPP	27,8 ± 2,3 / -- ‡	116,4 ± 4,2 / -- †
ADKPN 161 <sup>4</sup>	BBHPP	20,2 ± 2,5 / -- ‡	126,7 ± 0,8 / -- †
ADKPN 164 <sup>4</sup>	BBHPP	22,7 ± 1,6 / -- ‡	123,2 ± 7,0 / -- †
ADKPN 165 <sup>4</sup>	BBHPP	4,4 ± 2,7 / -- ‡	123,6 ± 9,1 / -- †
TC 225	TP	99,2 ± 5,2 / --	92,3 ± 1,8 / --
JOSHA 16	BF	89,2 ± 7,6 / --	92,6 ± 4,9 / --

†, valor corregido por la interferencia del compuesto con el ensayo.

‡, valor no corregido por la interferencia del compuesto con el ensayo.

Para los compuestos activos, se realizó una curva dosis-respuesta de 10 puntos (Figura 18). El ensayo se realiza de la misma manera que el *screening* primario, luego se grafica % Señal vs. Log<sub>10</sub> [Conc.] y se ajusta la sigmoide a una función de Boltzmann con el software Origin Pro 8.0 (Origin Lab Corporation). Con los datos del ajuste se calcula la CI<sub>50</sub> utilizando un método de derivadas parciales y se expresa como concentración ± error (el error se expresa como 2s, definido anteriormente, y las unidades se expresan en micromolar).





**Figura 18. Estructuras y curvas dosis-respuesta de los compuestos más activos contra *TbTryS*<sup>MUT</sup>.** En línea continua se muestra el ajuste a la función de Boltzmann a partir del cual se determinan los valores de  $CI_{50}$ .

Estos resultados muestran cómo ciertas familias de compuestos son más efectivas que otras a la hora de inhibir las enzimas. Tres compuestos de la familia de los ZEA, algunos ZVR y los AD 81 y 84 mostraron una alta capacidad inhibitoria de la *TbTryS*<sup>MUT</sup> con  $CI_{50}$  en el orden micromolar bajo, entre los que se destacan ZEA 3 ( $CI_{50}$  de  $4,3 \pm 2,9 \mu M$ ), ZEA 5 ( $CI_{50}$  de  $4,4 \pm 0,7 \mu M$ ), ZVR 107 ( $CI_{50}$  de  $5,2 \pm 0,5 \mu M$ ), ZVR 140 ( $CI_{50}$  de  $3,7 \pm 0,5 \mu M$ ), ZVR 157 ( $CI_{50}$  de  $7,5 \pm 1,2 \mu M$ ), y de los AD el 84 ( $CI_{50}$  de  $4,1 \pm 0,8 \mu M$ ). Mientras que los ADKPN, por ejemplo, mostraron un poder de inhibición moderado (25% – 50% de inhibición a  $30 \mu M$ ) y los APC, EAP, TC, JOSHA, KuMai, ASP y GAT inhiben poco o nada (<25% de inhibición a  $30 \mu M$ ) a *TbTryS*<sup>MUT</sup>. Contra *TbTryS*<sup>WT</sup> se encontraron únicamente compuestos con un poder de inhibición modereado, entre los que se destacan APC 1-89 (% inhibición de  $49,1 \pm 1,5 \%$  a  $30 \mu M$ ), APC 1-101 (% inhibición de  $38,8 \pm 1,8 \%$  a  $30 \mu M$ ), APC 1-111 (% inhibición de  $44,4 \pm 3,2 \%$  a  $30 \mu M$ ), KuRK 221 (% inhibición de  $45,2 \pm 4,1 \%$  a  $30 \mu M$ ) y KuRK 268 (% inhibición de  $47,6 \pm 7,0 \%$  a  $30 \mu M$ ). Esto deja en evidencia

una respuesta anti-*TbTryS* específica para cada variante de esta enzima al igual que se evidenció para la inhibición por GSH.

Esta selectividad de los compuestos por distintas isoformas de la TryS de *T. brucei* se traslada también a TryS de distintas especies de tripanosomátidos (Benítez y Charquero, no publicado).

### 4.3.2 Análisis de secuencias de *TbTryS*

Al alinear las secuencias codificantes para la *TbTryS*<sup>MUT</sup> y *TbTryS*<sup>WT</sup> se observó que difieren entre sí en cuatro aminoácidos, uno de ellos localizado en el dominio que tiene actividad amidasa y los otros tres en la región con actividad tripanotión sintetasa (Figura 19).



**Figura 19. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de *TbTryS*.** Las secuencias de *TbTryS*-MUT (Nr de acceso AAO00721) y *TbTryS*-WT (Nr de acceso CAC87573) corresponden a las reportadas por Comini y col. (2003) y Oza y col. (2003) respectivamente. La región del

dominio amidasa se señala con línea punteada y la del dominio sintetasa con línea continua. La secuencia sin marcas corresponde a la región que conecta ambos dominios. Los aminoácidos mutados se muestran en turquesa, fucsia, amarillo y gris. \*, residuos conservados; :, residuos con mutaciones conservadas (*score* > 0.5 en la matriz Gonnet PAM 250); ., mutaciones no conservadas (*score* ≤ 0.5 en la matriz Gonnet PAM 250). Se indica también la tríada catalítica del dominio amidasa (flechas), residuos de unión a Gsp (cuadrados), a ATP (círculos), a GSH (estrellas), SPD (rombos), y Mg<sup>2+</sup> (triángulos)<sup>5</sup>. En particular los residuos de arginina R<sup>547</sup> y R<sup>607</sup> han demostrado ser fundamentales para la actividad sintetasa de otra proteína de la misma familia, la TryS de *Crithidia fasciculata* (Comini 2005).

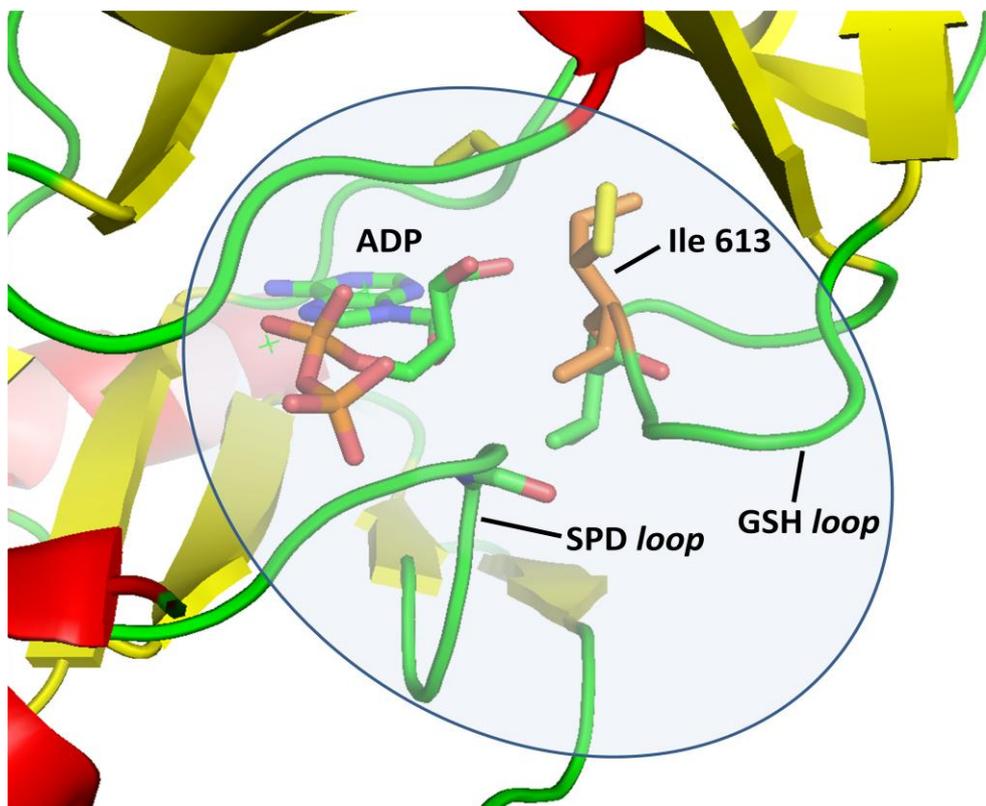
Para verificar si estas mutaciones están presentes en la cepa/línea celular de *T. brucei* utilizada en este trabajo o bien se originaron durante el proceso de aislamiento/amplificación y/o secuenciación del gen, se procedió a determinar nuevamente la secuencia del producto aislado originalmente y del gen de TryS presente en el genoma de *T. brucei* cepa 427 (trabajo llevado a cabo por la Lic. Lucía Fiestas). En ambos casos, los resultados confirmaron que la secuencia obtenida se corresponde exactamente con la secuencia WT reportada por Oza y col. (2003). Por lo tanto se deduce que estas mutaciones aparecieron por error durante la reacción de PCR original destinada al aislamiento y amplificación del ADN codificante para su inserción en el vector de expresión pET-22b(+) (Comini 2003).

De acuerdo a la localización de estas mutaciones no se prevé que las mismas alteren la actividad de la enzima ya que no están directamente involucradas en los sitios de unión de los diversos sustratos de la TryS, excepto por el residuo que ocupa la posición 613 el cual se halla próximo al sitio activo, en un *loop* que conferiría estabilidad a la unión de GSH (Koch 2013) y espacialmente adyacente a los sitios de unión de ATP y SPD (Pai 2011; Fyfe 2008; Figura 20). En este sentido nuestra hipótesis es que el reemplazo de un residuo no polar como la isoleucina (*TbTryS*<sup>WT</sup>) por una treonina (*TbTryS*<sup>MUT</sup>) destruiría una red de interacciones hidrofóbicas que involucra a varias láminas β adyacentes que dan forma al sitio activo y contribuyen a fijar la posición del *loop* que contiene a la Ile<sup>613</sup> y Gly<sup>615</sup>, que se extienden formando el bolsillo de unión de GSH (Koch 2013). Este último residuo ha sido descrito como clave para el correcto posicionamiento del grupo amino terminal de SPD y Gsp y, principalmente, para

---

<sup>5</sup> La doble marcación de algunos residuos se debe a que distintos autores han propuesto diferentes roles para los mismos.

el glicil-carboxilato de GSH. Por lo tanto, la ruptura de dichas interacciones dejaría espacialmente libre a este elemento no estructurado lo cual se trasladaría en cambios conformacionales en el sitio de unión a GSH y en consecuencia en una unión más débil de este sustrato. Por otro lado, esta conformación más abierta de los sitios de unión a sustratos (GSH y, eventualmente, SPD/Gsp) mejoraría la accesibilidad de ciertos compuestos al sitio catalítico de la *TbTryS*<sup>MUT</sup> y no de la *TbTryS*<sup>WT</sup>, y en consecuencia ejercerían la inhibición de la primera. Esta hipótesis ha sido recientemente validada mediante la generación y caracterización cinética de mutantes reversos en la *TbTryS*<sup>MUT</sup> (I<sup>613</sup>) y *TbTryS*<sup>WT</sup> (I<sup>613</sup>T) (Fiestas, Benítez y col., no publicado) y serán profundizados con estudios de simulación molecular en colaboración con el grupo del Dr. Oliver Koch (Technische Universität Dortmund, Alemania).



**Figura 20. Sitio activo y de unión de sustratos de GspS de *Escherichia coli*.** Modelo estructural del sitio activo de GspS obtenido a partir de datos de difracción de cristales de la enzima de *E. coli* en presencia de ADP y Gsp (PDB 3098). En la imagen se muestra el sitio catalítico y de unión a sustratos (marco ovalado) y destacan las regiones no estructuradas (*loop*) involucradas en contactar al GSH y SPD, así como una molécula de ADP ligada al sitio de unión de ATP. En naranja se muestra el residuo Ile<sup>605</sup>, correspondiente a la posición 613 de la *TbTryS*, localizado en el *loop* de unión de GSH y en proximidad con el ADP y región de unión a poliamina. El código de colores para el esqueleto de la estructura es: verde, regiones no estructuradas, rojo, hélices  $\alpha$  y amarillo, láminas  $\beta$ . La imagen fue generada con el programa PyMOL™ (Molecular Graphic System).

## 4.4 Actividad biológica contra la forma infectiva de *T. brucei*

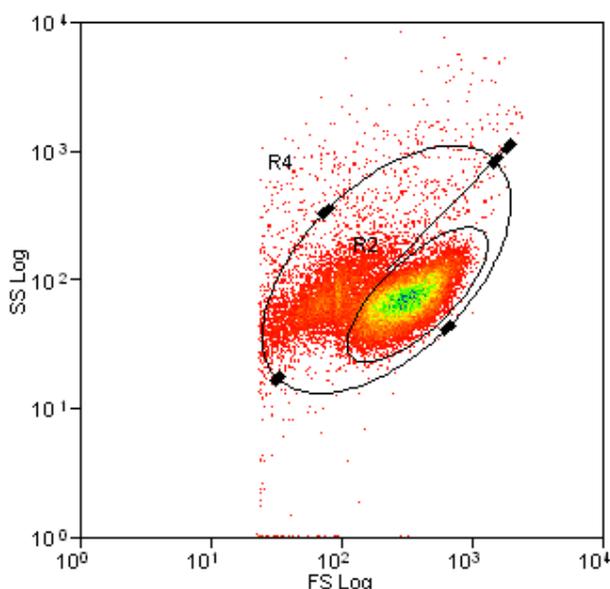
### 4.4.1 Puesta a punto del ensayo

La actividad de los compuestos que integran la quimioteca, también fue testeada contra el cultivo celular de la forma sanguínea de *T. brucei brucei* utilizando el ensayo descrito en el punto 3.4.2. Este ensayo es equivalente al recuento mediante cámara de Neubauer pero a gran escala, de manera más sensible, estadísticamente robusta y rápida. El formato del ensayo es en placa de 96 pocillos y permite testear 14 compuestos por placa, donde parte de la alta procesividad y sensibilidad de la técnica vienen dadas principalmente por el uso de la citometría de flujo para el conteo celular y un software asociado que permite procesar los datos adquiridos en bloque.

El tiempo de incubación con los compuestos es de 24 horas, el tiempo de lectura de una placa ronda las 4,5 horas y el procesamiento completo de los datos, cerca de 1 hora. El tiempo de lectura de la placa podría reducirse si se contara con un sistema de *auto-sampling*.

Otras ventajas que ofrece este método es el conteo directo de las células y no una medida indirecta como sería la medida de absorbancia de una reacción colorimétrica, por ejemplo, que puede dar lugar a falsos positivos, subestimación o sobreestimación del número de células. En consecuencia de la medida directa de las células que atraviesan el haz del laser este método es capaz de distinguir entre células viables y muertas por diferencias en su tamaño y granulosidad (Figura 21), con la posibilidad adicional de utilizar marcadores específicos ya sea de integridad de membrana (como el yoduro de propidio que se utiliza en este ensayo), apoptosis y otros más, e indagar así sobre el mecanismo de muerte. En ese sentido, en este trabajo se explora de manera preliminar el empleo de un sensor redox Grx1-roGFP2 que es capaz de detectar cambios en la relación GSH/GSSG a nivel intracelular ([Sardi y Comini, no publicado](#)). El biosensor es expresado por los parásitos de manera inducible y la intensidad de fluorescencia luego de excitación a 488 nm es proporcional a la

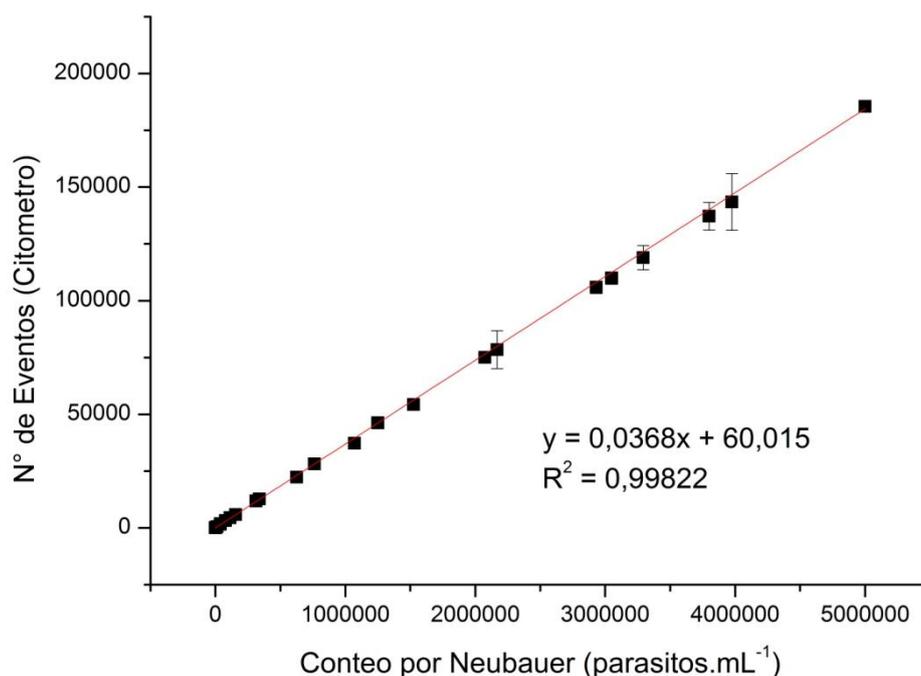
relación GSH/GSSG. Este método respeta la integridad celular y permite monitorear cambios dinámicos en los niveles de GSH/GSSG.



**Figura 21. "Dot-Plot" de tamaño vs granulosidad.** La región R2 se utiliza para estimar el nº de células viables frente al total (región R4).

Para demostrar la relación que existe entre el método tradicional de recuento manual en cámara de Neubauer y este novedoso método de citometría celular desarrollado en nuestro laboratorio se llevó a cabo un experimento donde se comparó la sensibilidad, linealidad y error obtenidos para ambos métodos. En un principio se normalizaba cada adquisición agregando perlas de conteo a la muestra y estableciendo el límite en 500 eventos para la región correspondiente a las perlas. Debido al alto costo de las mismas, se probó realizar adquisiciones a tiempo fijo (1 minuto) y fijando un flujo de adquisición entre 800 y 1200 eventos (células) por segundo que se mantuvo constante para cada ensayo, lo cual resultó ser exitoso para normalizar las medidas.

Así podemos afirmar que en las condiciones en que se trabaja, existe una relación lineal comprobada entre el número de parásitos vivos contados por citometría y el número de parásitos vivos contados en la cámara de Neubauer (Figura 22) aunque la misma no es directamente proporcional. El rango de linealidad abarca desde  $5 \times 10^2$  células.mL<sup>-1</sup> hasta  $5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 22. Gráfico de linealidad para el ensayo de recuento celular semi-automatizado de citometría de flujo *versus* conteo manual en cámara de Neubauer.**

El límite de detección por recuento en cámara de Neubauer (sin tener que concentrar la muestra) es de 1250 células.mL<sup>-1</sup> siendo el límite de detección del citómetro de 460 células.mL<sup>-1</sup>. Además, en el conteo manual por Neubauer es necesario diluir muestras con una densidad mayor a  $2,5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> para facilitar el conteo, mientras que el máximo en citometría se ubica por encima de 5 millones de células.mL<sup>-1</sup>.

En cuanto al error de la técnica, para Neubauer está estimado en  $\leq 20\%$  mientras que para el ensayo de citometría de flujo este fue significativamente inferior:  $\leq 5\%$ .

#### 4.4.2 Identificación de *hits*

Los compuestos se testean a dos concentraciones: 5 y 30  $\mu\text{M}$  por triplicado, se incluye un control positivo de viabilidad: DMSO al 100% y un control del 50% de viabilidad: Nifurtimox 15  $\mu\text{M}$  (Lampit®, Bayer). Además, al trabajar con la forma infectiva del parásito *Trypanosoma brucei brucei* cepa 427 línea celular 449 hGrx/roGFP2 se debe incluir un control no inducido por tetraciclina del sensor redox. Luego para los compuestos que muestran una alta tasa de muerte ( $>90\%$  a 5  $\mu\text{M}$ ), se realiza un nuevo test de viabilidad a diferentes

concentraciones del compuesto, ajustadas de acuerdo a la actividad del compuesto y su solubilidad en DMSO, para establecer su CE<sub>50</sub>.

Los resultados para la totalidad de los compuestos evaluados se encuentran en el Anexo 1. En la Tabla 3 se muestran sólo aquellos compuestos que tienen alto efecto citotóxico (inhibición del crecimiento >50% a 5 µM) y un representante de cada familia de compuestos que carece de actividad biológica contra el parásito.

**Tabla 3. Actividad biológica de compuestos contra la forma infectiva de *T. b. brucei*.** Se muestran todos los compuestos con una actividad inhibitoria del crecimiento > 50% a una concentración de 5 µM y alguno representativo de cada serie que no mostró efecto citotóxico. La nomenclatura abreviada para los núcleos estructurales es la siguiente: **ND**, información no disponible; **AI**, derivado de 4,5-dihidroazepino[4,5-b]indol-2(1H,3H,6H)-ona; **AI (P)**, significa que es una paulona y **AI (AZ)** que es una azapaulona; **SL**, derivado de una lactona de sesquiterpeno; **APPDA**, derivado de 6-arilpirido[2,3-d]pirimidin-2,7-diamina; **BBHPP**, derivado de 1-(benzo[d]tiazol-2-yl)-4-benzoil-3-hidroxi-5-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona; **NFPQ**, derivado de 2-(3-(5-nitrofurano-2-il)propil)quinolina; **BF**, derivado de benzo[c][1,2,5]oxadiazol N-óxido o benzofuroxano.

Compuesto	Datos Estructurales	% Viabilidad a 5 µM o 30 µM / CE <sub>50</sub> (µM) forma sanguínea de <i>T. b. brucei</i> cepa 427 (línea celular 449)	Intensidad GFP *
GAT 1033	ND	33,3 ± 4,8 / --	--
GAT 1088	ND	24,9 ± 2,6 / --	--
GAT 02111	ND	13,3 ± 3,1 / --	--
DM 1005	ND	19,1 ± 4,8 / --	--
DM 1015	ND	0 / 0,9 ± 0,1	- 8
DM 1025	ND	1,1 ± 0,9 / 3,8 ± 0,7	+ 5
DM 1035	ND	1,1 ± 0,5 / 1,8 ± 0,1	+ 6
DM 1120	ND	0 / 0,8 ± 0,1	- 3
DM 1180	ND	0 / 2,60 ± 0,03	+ 1
DM 1215	ND	0 / 0,46 ± 0,03	- 4
DM 1223	ND	6,5 ± 2,8 / --	--
DM 1257	ND	0,3 ± 0,3 / 1,8 ± 0,3	- 7
DM 1260	ND	0 / 0,62 ± 0,17	- 5
DM 1270	ND	16,8 ± 6,5 / --	--
DM 1273	ND	0 / 4,1 ± 1,3	- 1
DM 1298	ND	0 / ~ 1,41	- 9
PL 06	ND	0 / 0,81 ± 0,15	0
PL 07	ND	0 / 0,49 ± 0,08	- 3
PL 08	ND	0 / 0,57 ± 0,05	- 5
PL 13	ND	0 / ~ 0,71	0

PL 48	ND	$3,7 \pm 1,3 / 2,6 \pm 0,3$	- 12
PL 91	ND	$24,4 \pm 5,3 / --$	--
PL 106	ND	$39,1 \pm 2,5 / --$	--
PL 228	ND	$2,3 \pm 0,3 / --$	- 21
PL 229	ND	$26,9 \pm 0,7 / --$	--
PL 299	ND	$4,1 \pm 2,7 / 3,3 \pm 0,6$	- 3
T 3.5	ND	$47,1 \pm 4,0 / --$	--
T 16.5	ND	$0 / \sim 0,47$	- 8
KuRK 50	AI (P)	$21,4 \pm 2,0 / --$	+ 9
KuRK 60	AI (P)	$5,1 \pm 0,2 / \sim 1$	+ 99
KuRK 107	AI (P)	$1,2 \pm 0,5 / 0,13 \pm 0,01$	+ 47
KuRK 114	AI (P)	$0,8 \pm 0,2 / 0,11 \pm 0,01$	+ 28
KuRK 130	AI (AZ)	$4,0 \pm 0,6 / 1,09 \pm 0,32$	- 2
KuRK 174	AI (P)	$2,6 \pm 0,6 / 0,17 \pm 0,03$	+ 15
KuRK 197	AI (P)	$4,1 \pm 0,0 / 0,5 - 1$	+ 48
KuRK 221	AI (P)	$1,9 \pm 0,4 / 0,04 \pm 0,02$	+ 34
KuRK 249	AI (P)	$0,8 \pm 0,1 / 0,31 \pm 0,08$	+ 14
KuRK 256	AI (P)	$5,5 \pm 0,2 / 0,5 - 1$	+ 48
KuRK 258	AI (P)	$35,4 \pm 0,4 / --$	+ 42
KuRK 259	AI (P)	$4,3 \pm 4,0 / 0,43 \pm 0,21$	- 7
KuRK 268	AI (P)	$13,9 \pm 2,2 / --$	- 9
KuRK 269	AI (P)	$19,4 \pm 0,1 / --$	- 34
KuRK 270	AI (P)	$2,2 \pm 0,1 / 0,5 - 1$	+ 30
KuRK 278	AI (P)	$14,0 \pm 2,6 / --$	- 30
KuRK 279	AI (P)	$3,9 \pm 0,4 / \sim 2$	+ 36
KuMai 104	AI (AZ)	$19,3 \pm 5,2 / --$	+ 39
KuMai 163	AI (AZ)	$92,0 \pm 11,6 / --$	- 41
KuMai 348EE	AI (AZ)	$12,1 \pm 4,4 / --$	+ 78
KuMai 358EE	AI (AZ)	$1,2 \pm 0,1 / \sim 2,5$	+ 102
KuMai 360EE	AI (AZ)	$7,8 \pm 1,5 / 0,12 \pm 0,04$	+ 23
KuMai 361He	AI (AZ)	$7,3 \pm 0,9 / 0,45 \pm 0,12$	+ 2
KuMai 372EE	AI (AZ)	$3,9 \pm 0,3 / 0,18 \pm 0,02$	+ 24
KuMai 380	AI (AZ)	$44,5 \pm 2,7 / --$	+ 85
KuMai 385	AI (AZ)	$48,1 \pm 4,6 / --$	+ 55
KuMai 423	AI (P)	$2,5 \pm 0,2 / 0,14 \pm 0,07$	+ 28
ZEA 5	APPDA	$88,5 \pm 6,5 / --$	--
ZVR 140	APPDA	$65,6 \pm 4,5 / --$	--
AD 81	BBHPP	$-- / 13,3 \pm 3,3$	--
AD 84	BBHPP	$-- / \sim 23$	--
ADMRC 154	BBHPP	$27,2 \pm 1,2 / --$	--
ADKPN 165	BBHPP	$51,7 \pm 1,5 / --$	--
JOSHA 02	NFPQ	$-- / 3,5 \pm 0,5$	--
JOSHA 06	NFPQ	$-- / 4,2 \pm 1,2$	--
JOSHA 07	NFPQ	$-- / 1,7 \pm 0,1$	--
JOSHA 11	BF	$-- / 18,0 \pm 3,7$	--

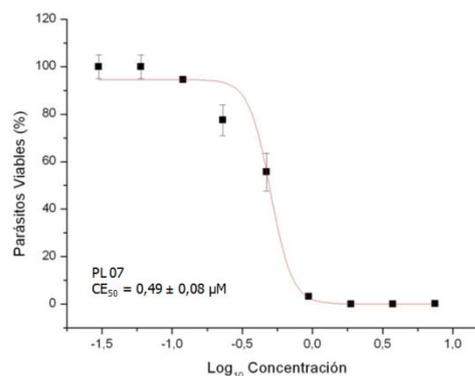
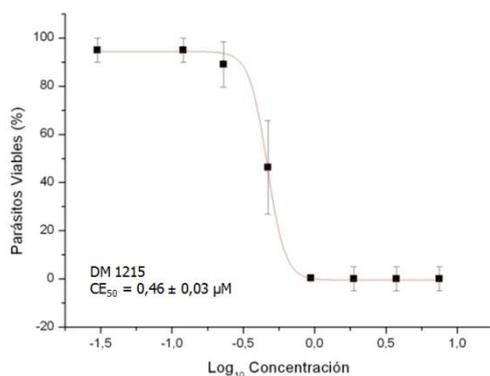
JOSHA 12	BF	-- / $14,2 \pm 9,5$	--
JOSHA 13	BF	-- / $4,6 \pm 0,2$	--
JOSHA 15	BF	-- / $11,8 \pm 2,0$	--
JOSHA 16	BF	-- / $1,24 \pm 0,04$	--
JOSHA 20	BF	-- / $13,3 \pm 3,3$	--
JOSHA 33	ND	$80,7 \pm 2,5$ / --	--
JOSHA 38	ND	$17,7 \pm 0,5$ / --	+ 73

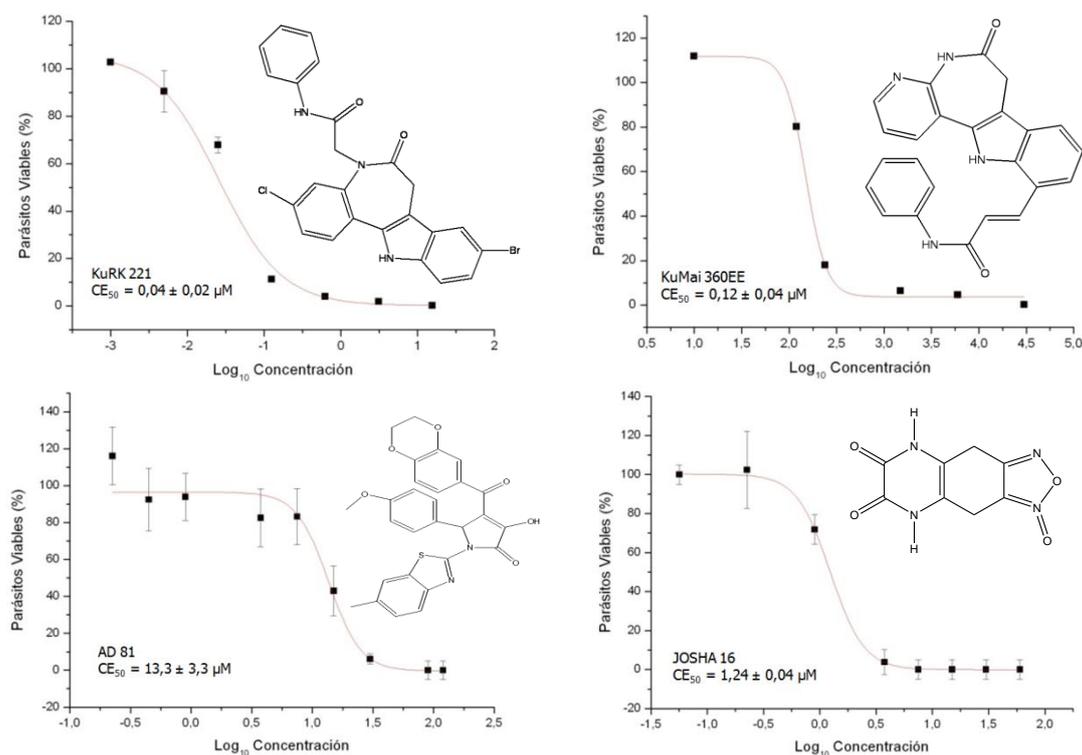
\*, valor calculado como  $I_{GFP} = IFR_{\text{compuesto}} - IFR_{c+}$  siendo IFR (intensidad de fluorescencia relativa) =  $[(I_c/I_{c-}) * 100] - 100$  donde  $I_c$  es la intensidad de fluorescencia del compuesto (o control positivo de inducción sin tratamiento con compuesto simbolizado como  $c+$ ) e  $I_{c-}$  es la intensidad de fluorescencia del control negativo no tratado y no inducido.

Dentro de las series de compuestos más activos se encuentran algunos DM, PL, KuRK y KuMai mientras que los ZEA, ZVR, ADMRC, ADKPN y la mayoría de los JOSHA, excepto por JOSHA 16 y 38, no son tan potentes.

#### 4.4.3 Cálculo de $CE_{50}$

En el ensayo contra parásitos viables, la curva dosis respuesta se construye con 7 medidas graficando % Viabilidad vs.  $\text{Log}_{10}$  [Conc.] (Figura 23) y se ajusta la sigmoide a una función de Boltzmann con el software Origin Pro 8.0 (Origin Lab Corporation). De los datos del ajuste se calcula la  $CE_{50}$  utilizando un método de derivadas parciales y se expresa como concentración  $\pm$  error (siendo el error  $2s$ , definido anteriormente, y las unidades se expresan en micromolar).



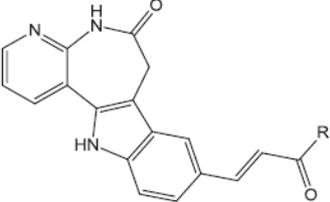
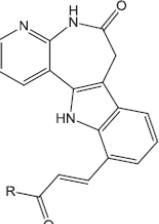


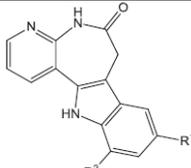
**Figura 23. Estructuras y curvas dosis-respuesta para los compuestos más activos contra la forma sanguínea del parásito *T. b. brucei*.** En línea continua se muestra el ajuste a la función de Boltzmann a partir del cual se determinan los valores de CE<sub>50</sub>.

Los compuestos con mayor actividad antiproliferativa identificados para cada familia son DM 1215 (CE<sub>50</sub> = 0,46 ± 0,03 μM) y DM 1260 (CE<sub>50</sub> = 0,62 ± 0,17 μM); PL 07 (CE<sub>50</sub> = 0,49 ± 0,08 μM) y PL 08 (CE<sub>50</sub> = 0,57 ± 0,05 μM); T 16.5 (CE<sub>50</sub> ~ 0,47 μM); KuRK 107 (CE<sub>50</sub> = 0,13 ± 0,01 μM), KuRK 114 (CE<sub>50</sub> = 0,11 ± 0,01 μM), KuRK 174 (CE<sub>50</sub> = 0,17 ± 0,03 μM), KuRK 249 (CE<sub>50</sub> = 0,31 ± 0,08 μM), KuRK 259 (CE<sub>50</sub> = 0,43 ± 0,21 μM) y KuRK 221 (CE<sub>50</sub> = 0,04 ± 0,02 μM); KuMai 360EE (CE<sub>50</sub> = 0,12 ± 0,04 μM), KuMai 361He (CE<sub>50</sub> = 0,45 ± 0,12 μM), KuMai 372EE (CE<sub>50</sub> = 0,18 ± 0,02 μM) y KuMai 423 (CE<sub>50</sub> = 0,14 ± 0,07 μM); AD 81 (CE<sub>50</sub> = 13,3 ± 3,3 μM), y JOSHA 16 (CE<sub>50</sub> = 1,24 ± 0,04 μM). En comparación con Nifurtimox la mayoría de estos novedosos compuestos presentaron índices de toxicidad contra *T. brucei* en el orden nanomolar y una potencia desde 10 (JOSHA 16) y hasta 375 (KuRK 221) veces superior al mismo.

Los compuestos más destacados por su potencia anti-tripanosoma son aquellos cuya estructura se basa en el núcleo heterocíclico de una paulona (7,12-dihidroindol[3,2-d][1]benzacepin-6(5H)-ona).

Si bien esta familia de compuestos son reconocidos inhibidores de proteínas quinasas de mamíferos, estudios de relación estructura-función demostraron que dicha selectividad puede ser eliminada al insertar un átomo de nitrógeno en la posición 4 del núcleo paulona (Kunick 2004). Los resultados de las evaluaciones realizadas aquí para la serie de compuestos KuMai sobre *TbTryS*<sup>WT</sup> y la forma infectiva de *T. brucei* fueron recientemente publicados (Maiwald 2014). A modo de resumen, se encontró que de la serie de azapaulonas sustituidas en la posición 9, las cianamidas secundarias KuMai 348EE y KuMai 358EE (Figura 24) mostraron una mayor actividad que la amida terciaria KuMai 336EE. Esta observación indica que tanto un dador de electrones en un enlace de hidrógeno, como un anillo aromático al final de la cadena lateral de estos derivados, otorgan cierta ventaja en cuanto a actividad. Mientras que los resultados con las azapaulonas sustituidas en la posición 11 son más heterogéneos. El híbrido chalcona-4-azapaulona KuMai 372EE presentó mayor actividad en comparación con sus análogos con un sustituyente metóxi- (KuMai 381) o cloro- (KuMai 410He) en el fenilo terminal. Pero el compuesto más potente de esta serie fue el KuMai 360EE. Esto demuestra que el motivo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado juega un papel importante en cuanto a la potencia anti tripanosoma (ej. los compuestos KuMai 158 y KuMai 176 no los poseen).

Nombre	Scaffold	R
KuMai 348EE		fenilamino-
KuMai 358EE		bencilamino-
KuMai 336EE		dietilamino-
KuMai 372EE		Ph-
KuMai 381		4-MeO-Ph-
KuMai 410He		4-Cl-Ph-
KuMai 360EE		fenilamino-

KuMai 158		$R^1 = H, R^2 = I$
KuMai 176		$R^1 = I, R^2 = H$

**Figura 24. Estructura de los compuestos mencionados en el análisis de relación estructura-actividad.**

La toxicidad no específica de todos estos compuestos también fue evaluada sobre macrófagos murinos como modelo celular de mamífero utilizando el sistema xCELLigence (Roche) siendo dicha toxicidad limitada en la gran mayoría de los casos. Esto quiere decir que a la mayor concentración testeada, la cual depende de la solubilidad de cada compuesto, ninguno de los derivados provocó una reducción en la viabilidad de más del 50%. Aquellos que mostraron mayor actividad anti-tripanosoma, KuMai 372EE y KuMai 360EE, tienen un % de toxicidad de  $(28,3 \pm 7,9)$  % a  $26 \mu\text{M}$  y  $(74,7 \pm 4,4)$  % a  $60 \mu\text{M}$  respectivamente. De estos datos se infiere que el índice de selectividad estimado frente a parásitos es al menos dos órdenes de magnitud mayor que contra macrófagos para el compuesto KuMai 372EE y a su vez éste no inhibe ninguna de las quinasas de la familia CMGC a  $10 \mu\text{M}$ . Por otra parte, la azapaulona KuMai 360EE fue identificada como un inhibidor selectivo de la caseína quinasa 1 de mamífero con una  $\text{CI}_{50}$  de  $0,49 \mu\text{M}$ .

Para finalizar, teniendo en cuenta que la *TbTryS* expresada por la línea sobre la que se evaluaron los compuestos es idéntica a la *TbTryS*<sup>WT</sup> (ver sección 4.3.2) y que algunos compuestos que no inhibieron a la enzima en el ensayo *in vitro* sí presentaron actividad anti-tripanosoma (KuRK 60, 107, 114, 130, 174, 197, 221, 249, 256, 259, 270, 279, KuMai 358EE, 360EE, 361He, 372EE, 423, JOSHA 02, 06, 07, 13 y 16), esto indica fuertemente que dichas moléculas tienen como blanco otra enzima o ruta metabólica que no es la TryS tal cual lo sugieren algunos experimentos de *docking* (Maiwald 2014); sin embargo el modo de acción no se conoce aún.

#### 4.4.4 Uso del biosensor redox ro-GFP2

La sonda fluorescente ro-GFP2 es una proteína derivada de la GFP a la cual se le introdujeron 2 residuos de cisteína en la posición 147 y 204 (dentro del barril

beta), el primero de ellos adyacente a un residuo de histidina (posición 149) que influye en el estado de protonación del cromóforo y por lo tanto en las propiedades espectrales de la proteína. Justamente, el estado redox de ese par de cisteínas (ej. reducido o formando un disulfuro intramolecular) conlleva cambios conformacionales que afectan la localización de la His<sup>149</sup> y la absorción de luz a 488 nm (y 405 nm) de la roGFP2, y en consecuencia, la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm (Meyer y Dick 2010). En la fusión Grx-roGFP2, la glutarredoxina cumple el rol de transductor de señal ya que ésta oxidoreductasa posee gran especificidad para reaccionar con GSH/GSSG y de esta forma acelerar la reducción y oxidación de la roGFP2 mediada por GSH y GSSG, respectivamente. Expresando esta proteína en la cepa de *T. b. brucei* utilizada para este ensayo es que podemos inferir el estado redox de la dupla GSH/GSSG, cuyo equilibrio dependería en última instancia del tripanotión. Se espera que compuestos interfiriendo con el metabolismo redox del parásito produzcan cambios en los niveles de GSH/GSSG y por lo tanto puedan medirse con este biosensor. Vale la pena destacar que este biosensor demostró ser extremadamente sensible para detectar concentraciones nanomolares (10 nM) de GSSG (Gutscher 2008).

Respecto a la intensidad de fluorescencia de la GFP, se obtuvieron datos interesantes. Para una mejor comprensión de los mismos se ha elaborado una escala arbitraria (reflejada en la Tabla 3) que compara por diferencia, la intensidad de fluorescencia del control negativo (sin tratamiento) con los parásitos tratados. Cabe aclarar que mientras una disminución en la fluorescencia indica oxidación de los tioles de roGFP2 y por ende un estado de mayor *stress* para el parásito, un aumento en la fluorescencia puede deberse a la autofluorescencia del compuesto, por lo que análisis futuros incluirán un control de parásitos tratados pero no inducidos para descartar dicha interferencia. A modo de ejemplo, se destacan los compuestos de la serie DM que mostraron buena actividad anti-proliferativa e intensidades GFP 10 unidades por encima o por debajo del valor del control no inducido pero los compuestos KuRK con aún mayor potencia biológica mostraron intensidades GFP positivas en su mayoría.

## 5 CONCLUSIONES

En este trabajo se logró expresar y purificar la tripanotión sintetasa de *Trypanosoma brucei* en sus versiones WT y MUT con rendimientos de aproximadamente 1,5 mg (*TbTryS*<sup>MUT</sup>) y 2,6 mg (*TbTryS*<sup>WT</sup>) de enzima por litro de medio de cultivo y una pureza mayor al 95% en ambos casos. Se optimizaron las condiciones de almacenamiento de estas enzimas a una concentración de  $\sim 1,5 \mu\text{M}$  en buffer de reacción y 40% v/v de glicerol a  $-20^\circ\text{C}$  logrando que sean estables por un tiempo prolongado (retención de al menos 60% de actividad enzimática inicial al cabo de 10 meses).

El laboratorio cuenta con una biblioteca de compuestos de los cuales se han analizado algo más de 250 mediante el ensayo de punto final en formato de alta procesividad. La caracterización cinética de estas enzimas (realizada parcialmente en este trabajo y de manera completa en nuestro laboratorio; Benítez y col. no publicado) permitió ajustar las concentraciones de sustrato (GSH y ATP) de acuerdo a los valores de inhibición por sustrato y producto que poseen estas enzimas y, en la medida de lo posible, respetando los valores de concentraciones intracelulares reportados en la bibliografía para *T. brucei*. Un par de datos sumamente interesantes fueron obtenidos a partir del análisis cinético y molecular de las *TbTryS*. Por un lado logramos identificar al producto ADP como un potencial regulador fisiológico negativo de la actividad enzimática. Por otro lado, logramos poner en evidencia la importancia estructural de un residuo hidrofóbico en la posición 613 que da forma al sitio activo de la enzima y estaría involucrado en la interacción con GSH, lo cual nos permitió comprender la marcada especificidad de ciertos inhibidores por la enzima mutada.

Fue posible desarrollar un ensayo colorimétrico relativamente económico (precios al 02/05/2013: U\$S 0,06 de reactivo BIOMOL Green™ por pocillo del ensayo de punto final frente a U\$S 0,08 por cada medida del ensayo cinético), robusto, altamente reproducible y en formato HTS para el cribado de compuestos con actividad anti-TryS. La estrategia de *screening* incluyó además

el diseño de un algoritmo de trabajo que permitió seleccionar verdaderos inhibidores con una tasa de error igual a 0. Los pasos implementados incluyeron: 1) el cribado de compuestos a una concentración de 30  $\mu\text{M}$ , 2) la evaluación de interferencia con el reactivo colorimétrico para compuestos que presentasen una inhibición de la actividad enzimática  $\geq 50\%$  y 3) la determinación de la  $\text{CI}_{50}$ .

Para el procesamiento y almacenamiento de la gran cantidad de datos que generan los ensayos de este tipo, se elaboraron planillas de cálculo optimizadas en Microsoft Excel que permitieron la obtención automática de los cálculos de resultados y errores asociados al experimento luego del ingreso (por copiado y pegado) de los datos obtenidos del lector de placas. Dichos resultados fueron siempre sometidos a un posterior análisis y validación por parte del investigador.

El cribado contra la enzima salvaje permitió detectar algunos *scaffolds* estructurales derivados de paulonas (KurK 221 y 268) y las bis-bencil poliaminas con sustituciones en los anillos bencénicos (APC 1-89, 1-101 y 1-111) con valores de  $\text{CI}_{50}$  de aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ , lo cual los convierte en moléculas modelo para avanzar en el diseño racional de inhibidores más potentes contra TryS. Es importante destacar que el modo de acción previamente reportado para ambas clases de compuestos está estrechamente relacionado a la TryS. Las paulonas aquí identificadas están relacionadas a las descritas recientemente como inhibidores de TryS de *C. fasciculata* (Flohé 2012) y de *L. infantum* (Sousa 2014), y que las bis-bencil poliaminas son compuestos con capacidad de inhibir componentes del metabolismo de poliaminas (Bitonti 1988; Bitonti 1990).

Por su concepción y por cuestiones de especificidad ligando-proteína, esperábamos que muchos compuestos de la quimioteca no tuvieran como blanco único o principal a la *TbTryS* pero que de todos modos pudieran presentar una buena actividad biológica contra la forma infectiva del parásito y por tanto ser buenos candidatos a fármacos. Por eso consideramos sumamente importante evaluar el potencial de los mismos para inhibir la proliferación de la

forma infectiva del patógeno en condiciones de cultivo *in vitro* y mediante un ensayo de alta procesividad. Para ello se desarrolló un ensayo multiparamétrico de cribado de compuestos que se basa en el recuento y caracterización por citometría de flujo de la cepa 427 línea 449 de *T. brucei brucei* (forma sanguínea transfectada con el gen que expresa el biosensor redox Grx1-roGFP2). Este ensayo fue puesto a punto para su realización en formato HTS sobre placas de 96 pocillos por triplicado para dos concentraciones de compuestos e incluyendo 6 réplicas de los controles, y mostró poseer una importante robustez estadística (errores menores al 5%) y velocidad de ejecución y procesamiento (4,5 horas/placa) respecto del recuento manual (error del 20% y > 10 horas/placa). También hemos logrado explorar el potencial que ofrece esta técnica de realizar determinaciones multiparamétricas mediante el empleo de una línea celular del patógeno que expresa un biosensor redox derivado de la proteína verde fluorescente y del ioduro de propidio. Estos marcadores resultaron válidos para detectar cambios redox intracelulares (por ej. estrés oxidativo) y daño de membrana celular generada por la acción de los compuestos.

También para este ensayo celular se trabajó en el desarrollo de un algoritmo de trabajo que permitió realizar un *screening* primario de actividad para una rápida selección de compuestos con potencia biológica contra tripanosomas. Para incrementar la velocidad de procesamiento e interpretación de los datos adquiridos por citometría se implementó el trabajo con el programa FlowJo 7.6.5 (Tree Star, Inc.) que permite hacer análisis "en *batch*" de los resultados.

Este trabajo dio lugar a la identificación de cerca de 21 compuestos (de un total de 137 evaluados) que presentaron una CE<sub>50</sub> en el orden submicromolar ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) contra *T. brucei* infectivo, lo cual representa una tasa de éxito del 10%. Casi un tercio de de estos compuestos mostraron además una potencia citotóxica contra el patógeno dos órdenes de magnitud superior a la de Nifurtimox, último fármaco aprobado para uso terapéutico de tripanosomiasis africana en combinación con efluornitina. Un grupo de estos compuestos, las 4-azapaulonas, presentaron además una baja toxicidad contra células de

mamíferos y no resultaron ser inhibidores de un conjunto de 8 quinasas de mamíferos, siendo la única excepción KuMai 360EE que presentó una  $CI_{50}$  de  $0,49 \mu\text{M}$  para la caseína quinasa 1. Estas estructuras están siendo actualmente sometidas a optimización para incrementar aún más su actividad anti-tripanosoma dado que ofrecen gran potencial para el desarrollo de fármacos contra tripanosomas africanos. Los resultados de este trabajo han sido publicados en el artículo de Maiwald y col. (2014) y el resto de los datos obtenidos para las paulonas bajo el código de KurK forman parte de un manuscrito que se encuentra en preparación.

Más allá de los logros técnicos alcanzados en este trabajo, como la puesta a punto de técnicas de cribado de compuestos por blanco molecular o fenotipo celular, se resalta el haber logrado identificar varios compuestos con potencial para ser desarrollados como inhibidores de TryS o parasiticidas contra *T. brucei*.

## **6 AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, sobre todo a mis padres que siempre me incentivaron a estudiar y seguir una carrera universitaria, por todo el apoyo que me brindaron para conseguirlo.

A mis mejores amigos, por seguir desde el inicio esta etapa tan importante de mi vida, y a Stefanía por sumarse en la recta final, la parte más importante, por apoyarme y siempre dar aliento para seguir adelante.

Y por supuesto, agradezco a Marcelo por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, a Diego por entrenarme, y al resto de mis compañeros de laboratorio por todo lo que me enseñaron y por sus consejos diarios.

## 7 REFERENCIAS

Amsoms K, Oza SL, Ravaschino E, Yamani A, Lambeir A, Rajan P, Bal G, Rodriguez J, Fairlamb AH, Augustyns K, Haemers A (2002) Glutathione-like tripeptides as inhibitors of glutathionylspermidine synthetase. Part 1: Substitution of the glycine carboxylic acid group. *Bioorg Med Chem Lett* 12(18):2553-6.

Archer JR (2004) History, evolution, and trends in compound management for high throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 2(6):675-81.

Bajorath J (2002) Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 1(11):882-94.

Barrett MP, Boykin DW, Brun R, Tidwell RR (2007) Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol* 152(8):1155-71.

Bass BL (2000) Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101(3):235-8.

Bitonti AJ, McCann PP, Sjoerdsma A (1988) The effects of polyamine analogues on malaria parasites in vitro and in vivo. *Adv Exp Med Biol* 250:717-26.

Bitonti AJ, Dumont JA, Bush TL, Stemerick DM, Edwards ML, McCann PP (1990) Bis(benzyl)polyamine analogs as novel substrates for polyamine oxidase. *J Biol Chem* 265(1):382-8.

Bleicher KH, Böhm HJ, Müller K, Alanine AI (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 2(5):369-78.

Botero D, Restrepo M (2003) Tripanosomiasis. En: *Parasitosis Humanas. Corporación para Investigaciones Biológicas* 7:231-33

Brown D, Superti-Furga G (2003) Rediscovering the sweet spot in drug discovery. *Drug Discov Today* 8(23):1067-77.

Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C (2010) Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375(9709):148-59.

Caponigro G, Abedi MR, Hurlburt AP, Maxfield A, Judd W, Kamb A (1998) Transdominant genetic analysis of a growth control pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(13):7508-13.

CDC, Centros para el control y la Prevención de Enfermedades (2012) <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/>

Chen S, Coward JK (1998) Investigations on New Strategies for the Facile Synthesis of Polyfunctionalized Phosphinates: Phosphinopeptide Analogues of Glutathionylspermidine. *J Org Chem* 63(3):502-509.

Comini MA, Menge U, Flohé L (2003) Biosynthesis of trypanothione in *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Chem* 384(4):653-6.

Comini MA, Guerrero SA, Haile S, Menge U, Lünsdorf H, Flohé L (2004) Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radic Biol Med* 36(10):1289-302

Comini MA, Menge U, Wissing J, Flohé L (2005) Trypanothione synthesis in crithidia revisited. *J Biol Chem* 280(8):6850-60.

D'Silva C, Daunes S (2000) Structure-activity study on the in vitro antiprotozoal activity of glutathione derivatives. *J Med Chem* 43(10):2072-8.

De Craecker S, Verbruggen C, Rajan PK, Smith K, Haemers A, Fairlamb AH (1997) Characterization of the peptide substrate specificity of glutathionylspermidine synthetase from *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 84(1):25-32.

Docampo R, Moreno SN (2003) Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 90(1):S10-3.

DNDi, "Drugs for Neglected Diseases initiative" (2013)  
<http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>

Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A (1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 227(4693):1485-7.

Flohé L (2012) The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnol Adv* 30(1):294-301.

Fyfe PK, Oza SL, Fairlamb AH, Hunter WN (2008) Leishmania trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J Biol Chem* 283(25):17672-80.

Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods* 5(6):553-9.

Hopkins AL, Groom CR (2002) The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov* 1(9):727-30.

Ilag LL, Ng JH, Beste G, Henning SW (2002) Emerging high-throughput drug target validation technologies. *Drug Discov Today* 7(18 Suppl):S136-142.

Jacobs RT, Nare B, Wring SA, Orr MD, Chen D, Sligar JM, Jenks MX, Noe RA, Bowling TS, Mercer LT, Rewerts C, Gaukel E, Owens J, Parham R, Randolph R, Beaudet B, Bacchi CJ, Yarlett N, Plattner JJ, Freund Y, Ding C, Akama T, Zhang YK, Brun R, Kaiser M, Scandale I, Don R (2011) SCYX-7158, an orally-active benzoxaborole for the treatment of stage 2 Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6):e1151

Kennedy PG (2004) Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *J Clin Invest* 113(4):496-504.

Kennedy PG (2006a) Human African trypanosomiasis-neurological aspects. *J Neurol* 253(4):411-6.

Kennedy PG (2006b) Diagnostic and neuropathogenesis issues in human African trypanosomiasis. *Int J Parasitol* 36(5):505-12.

Keseru GM, Makara GM (2006) Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov Today* 11(15-16):741-8.

Koch O, Cappel D, Nocker M, Jäger T, Flohé L, Sotriffer CA, Selzer PM (2013) Molecular dynamics reveal binding mode of glutathionylspermidine by trypanothione synthetase. *PLoS One* 8(2):e56788.

Krauth-Siegel RL, Comini MA (2008) Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1780(11):1236-48.

Kunick C, Lauenroth K, Wieking K, Xie X, Schultz C, Gussio R, Zaharevitz D, Leost M, Meijer L, Weber A, Jørgensen FS, Lemcke T (2004) Evaluation and comparison of 3D-QSAR CoMSIA models for CDK1, CDK5, and GSK-3 inhibition by paullones. *J Med Chem* 47(1):22-36.

Kuzoe FA (1993) Current situation of African trypanosomiasis. *Acta Trop* 54:153-162.

Leroux AE, Haanstra JR, Bakker oBM, Krauth-Siegel RL (2013) Dissecting the catalytic mechanism of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase by kinetic analysis and computational modeling. *J Biol Chem* 288(33):23751-64.

Lin CH, Kwon DS, Bollinger JM Jr, Walsh CT (1997) Evidence for a glutathionyl-enzyme intermediate in the amidase activity of the bifunctional glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 36(48):14930-8.

Louis FJ, Simarro PP (2005) Rough start for the fight against sleeping sickness in French equatorial Africa. *Med Trop (Mars)* 65:251–57.

Maiwald F, Benítez D, Charquero D, Dar MA, Erdmann H, Preu L, Koch O, Hölscher C, Loaëc N, Meijer L, Comini MA, Kunick C (2014) 9- and 11-substituted 4-azapallones are potent and selective inhibitors of African trypanosoma. *Eur J Med Chem* 83C:274-283.

Mandal S, Moudgil M, Mandal SK (2009) Rational drug design. *Eur J Pharmacol* 625(1-3):90-100.

Manta B, Pavan C, Sturlese M, Medeiros A, Crispo M, Berndt C, Krauth-Siegel RL, Bellanda M, Comini MA (2013) Iron-sulfur cluster binding by mitochondrial monothiol glutaredoxin-1 of *Trypanosoma brucei*: molecular basis of iron-sulfur cluster coordination and relevance for parasite infectivity. *Antioxid Redox Signal* 19(7):665-82.

Marcello L, Barry JD (2007) Analysis of the VSG gene silent archive in *Trypanosoma brucei* reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome Res* 17(9):1344-52.

Meyer AJ, Dick TP (2010) Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13(5):621-50.

Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol* 19(12):1173-6.

NHGRI, National Human Genome Research Institute (2013)  
*National Institutes of Health* <http://www.genome.gov/12514551>

Nok AJ (2003) Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 90(1):71-9.

OMS, Organización Mundial de la Salud (2012)  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/>

Oza SL, Ariyanayagam MR, Aitcheson N, Fairlamb AH (2003) Properties of trypanothione synthetase from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 131(1):25-33.

Pai CH, Wu HJ, Lin CH, Wang AH. (2011) Structure and mechanism of *Escherichia coli* glutathionylspermidine amidase belonging to the family of cysteine; histidine-dependent amidohydrolases/peptidases. *Protein Sci* 20(3):557-66.

Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V (2009) Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* 374(9683):56-64.

Ravaschino EL, Docampo R, Rodriguez JB (2006) Design, synthesis, and biological evaluation of phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* targeting trypanothione biosynthesis. *J Med Chem* 49(1):426-35.

Rubenwolf S, Niewöhner J, Meyer E, Petit-Frère C, Rudert F, Hoffmann PR, Ilag LL (2002) Functional proteomics using chromophore-assisted laser inactivation. *Proteomics* 2(3):241-6.

Schreiber SL (2000) Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science* 287(5460):1964-9.

Sharp PA (1999) RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev* 13(2):139-41.

Sousa AF, Gomes-Alves AG, Benítez D, Comini MA, Flohé L, Jaeger T, Passos J, Stuhlmann F, Tomás AM, Castro H (2014) Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. *Free Radic Biol Med* 73:229-38.

Steenkamp DJ (2002) Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal* 4(1):105-21.

Stockdale C, Swiderski MR, Barry JD, McCulloch R (2008) Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: joining the DOTs. *PLoS Biol* 6(7):e185.

Taylor MC, Kaur H, Blessington B, Kelly JM, Wilkinson SR (2008) Validation of spermidine synthase as a drug target in African trypanosomes. *Biochem J* 409(2):563-9.

Torreele E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, Mazué G, Bray MA, Pécoul B (2010) Fexinidazole – a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 4(12):e923

Torrie LS, Wyllie S, Spinks D, Oza SL, Thompson S, Harrison JR, Gilbert IH, Wyatt PG, Fairlamb AH, Frearson JA (2009) Chemical validation of trypanothione synthetase: a potential drug target for human trypanosomiasis. *J Biol Chem* 284(52):36137-45.

Tuerk C (1997) Using the SELEX combinatorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules. *Methods Mol Biol* 67:219-30.

Van Den Abbeele J, Claes Y, van Bockstaele D, Le Ray D, Coosemans M (1999) Trypanosoma brucei spp. development in the tsetse fly: characterization of the post-mesocyclic stages in the foregut and proboscis. *Parasitology* 118(5):469-78.

Wirtz E, Clayton C (1995) Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* 268(5214):1179-83.

Wyatt PG, Gilbert IH, Read KD, Fairlamb AH (2011) Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile. *Curr Top Med Chem* 11(10): 1275-83.

Wyllie S, Oza SL, Patterson S, Spinks D, Thompson S, Fairlamb AH (2009) Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. *Mol Microbiol* 74(3):529-40.

Yang X, Parker D, Whitehead L, Ryder NS, Weidmann B, Stabile-Harris M, Kizer D, McKinnon M, Smellie A, Powers D (2006) A collaborative hit-to-lead investigation leveraging medicinal chemistry expertise with high throughput library design, synthesis and purification capabilities. *Comb Chem High Throughput Screen* 9(2):123-30.

Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4(2):67-73.

Zheng CJ, Han LY, Yap CW, Ji ZL, Cao ZW, Chen YZ (2006) Therapeutic targets: progress of their exploration and investigation of their characteristics. *Pharmacol Rev* 58(2):259-79

Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M, Snyder M (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293(5537):2101-5.

# ANEXO 1

Compuesto	Datos Estructurales	% Actividad a 30 $\mu\text{M}$ / $\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )		% Viabilidad a 30 $\mu\text{M}$ o a 5 $\mu\text{M}$ / $\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	Intensidad GFP *
		<i>TbTryS</i> <sup>MUT</sup>	<i>TbTryS</i> <sup>WT</sup>	<i>Tbb 427</i> (línea 449)	
<b>Origen:</b> Dra. Mercedes González, Lab. de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.					
ASP 1	ND	110,5 $\pm$ 8,4 / --	--	--	--
ASP 2	ND	112,3 $\pm$ 9,8 / --	--	--	--
ASP 3	ND	104,2 $\pm$ 8,2 / --	--	--	--
ASP 4	ND	84,4 $\pm$ 7,8 / --	--	--	--
ASP 5	ND	96,2 $\pm$ 4,8 / --	--	--	--
ASP 6	ND	96,5 $\pm$ 6,3 / --	--	--	--
ASP 7	ND	92,9 $\pm$ 2,3 / --	--	--	--
ASP 8	ND	94,9 $\pm$ 5,0 / --	--	--	--
ASP 9	ND	99,5 $\pm$ 6,5 / --	--	--	--
ASP 10	ND	97,3 $\pm$ 7,9 / --	--	--	--
ASP 11	ND	92,2 $\pm$ 2,5 / --	--	--	--
ASP 12	ND	104,1 $\pm$ 3,3 / --	--	--	--
ASP 13	ND	105,7 $\pm$ 10,4 / --	--	--	--
ASP 14	ND	98,1 $\pm$ 7,9 / --	--	--	--
ASP 15	ND	100,7 $\pm$ 11,2 / --	--	--	--
ASP 16	ND	102,0 $\pm$ 7,7 / --	--	--	--
ASP 17	ND	106,4 $\pm$ 5,9 / --	--	--	--
ASP 18	ND	105,6 $\pm$ 4,6 / --	--	--	--
ASP 19	ND	105,0 $\pm$ 3,9 / --	--	--	--
ASP 20	ND	108,7 $\pm$ 9,5 / --	--	--	--
ASP 22	ND	95,7 $\pm$ 11,0 / --	--	--	--
ASP 23	ND	88,5 $\pm$ 7,9 / --	--	--	--
EC 1	NF	108,0 $\pm$ 5,7 / --	--	--	--
Nfx	NF	--	--	32,2 $\pm$ 5,2 / --	--
<b>Origen:</b> Dr. Guzmán Álvarez, Lab. de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.					
GAT 0803	NF	97,1 $\pm$ 6,5 / --	--	--	--
GAT 0804	NF	97,3 $\pm$ 7,6 / --	--	--	--
GAT 0908	ND	110,1 $\pm$ 9,8 / --	--	--	--
GAT 0918	ND	105,2 $\pm$ 3,3 / --	--	--	--
GAT 0923	ND	99,4 $\pm$ 5,7 / --	--	--	--
GAT 0925	ND	106,4 $\pm$ 9,9 / --	--	--	--
GAT 1012	ND	93,7 $\pm$ 7,8 / --	--	--	--
GAT 1027	ND	94,3 $\pm$ 5,8 / --	--	--	--
GAT 1029	ND	101,9 $\pm$ 9,9 / --	--	--	--
GAT 1031	ND	95,3 $\pm$ 13,9 / --	--	--	--
GAT 1033	ND	--	--	33,3 $\pm$ 4,8 / --	--
GAT 1049	ND	106,5 $\pm$ 2,8 / --	--	--	--

GAT 1057	ND	108,5 ± 6,3 / --	--	--	--
GAT 1058	ND	104,5 ± 4,3 / --	--	--	--
GAT 1060	ND	97,0 ± 5,8 / --	--	--	--
GAT 1062	ND	110,9 ± 10,3 / --	--	--	--
GAT 1063	ND	83,7 ± 4,9 / --	--	--	--
GAT 1064	ND	101,8 ± 4,7 / --	--	--	--
GAT 1068	ND	107,7 ± 7,0 / --	--	--	--
GAT 1075	ND	96,9 ± 1,9 / --	--	--	--
GAT 1082	ND	--	--	4,2 ± 0,3 / --	--
GAT 1088	ND	76,2 ± 4,9 / --	--	24,9 ± 2,6 / --	--
GAT 1092	ND	93,7 ± 3,4 / --	--	--	--
GAT 1096	ND	98,9 ± 8,0 / --	--	--	--
GAT 1112	ND	87,6 ± 6,7 / --	--	--	--
GAT 1212	ND	91,8 ± 4,6 / --	--	--	--
GAT 02111	ND	--	--	13,3 ± 3,1 / --	--
GAT 02311	ND	91,4 ± 4,5 / --	--	--	--
GAT 10102	ND	74,1 ± 9,0 / --	--	--	--
GAT 10117	ND	79,3 ± 4,4 / --	--	--	--
<b>Origen:</b> Dra. Gloria Serra, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.					
46	ND	104,5 ± 7,7 / --	--	--	--
48	ND	109,5 ± 6,4 / --	--	--	--
49	ND	101,1 ± 6,9 / --	--	--	--
54	ND	102,3 ± 3,7 / --	--	--	--
55	ND	110,2 ± 6,2 / --	--	--	--
56	ND	81,3 ± 2,1 / --	--	--	--
57	ND	104,3 ± 7,2 / --	--	--	--
SP 14	ND	106,7 ± 5,6 / --	--	--	--
SP 19	ND	100,8 ± 5,3 / --	--	--	--
SP 22	ND	109,8 ± 4,1 / --	--	--	--
SP 27	ND	103,4 ± 8,3 / --	--	--	--
SP 29	ND	101,8 ± 3,5 / --	--	--	--
SP 33	ND	121,1 ± 12,6 / -- <sup>†</sup>	--	--	--
SP 36	ND	110,2 ± 3,4 / --	--	--	--
SP 38	ND	117,6 ± 6,0 / -- <sup>†</sup>	--	--	--
SP 39	ND	103,9 ± 0,5 / --	--	--	--
SP 076	ND	105,7 ± 3,0 / --	--	--	--
FPBT 1	ND	103,8 ± 3,5 / --	--	--	--
FPBT 2	ND	110,7 ± 3,4 / --	--	--	--
SPBISOXA2	ND	99,5 ± 7,3 / --	--	--	--
SPMacro3OXA2	ND	104,9 ± 5,2 / --	--	--	--
SPOXA1OXA2	ND	109,3 ± 6,7 / --	--	--	--
SPTZ 1	ND	102,5 ± 7,5 / --	--	--	--
<b>Origen:</b> Dr. Guillermo Labadie, IQUIR, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina.					
APC 1-67	DAB	97,4 ± 6,0 / --	71,9 ± 4,6 / --	--	--
APC 1-71B	DAB	71,8 ± 2,8 / --	66,0 ± 0,7 / --	--	--

APC 1-79	DAB	86,7 ± 5,5 / -- <sup>†</sup>	66,0 ± 2,9 / --	--	--
APC 1-82	DAB	115,6 ± 5,9 / -- <sup>‡</sup>	88,1 ± 4,4 / --	--	--
APC 1-87	DAB	84,0 ± 2,8 / -- <sup>†</sup>	62,1 ± 4,0 / --	--	--
APC 1-89	DAB	88,6 ± 2,6 / -- <sup>†</sup>	49,1 ± 1,5 / -- <sup>†</sup>	--	--
APC 1-93	DAB	105,9 ± 8,6 / --	94,0 ± 9,1 / --	--	--
APC 1-98	DAB	101,0 ± 3,4 / --	72,8 ± 3,7 / --	--	--
APC 1-99	DAB	88,0 ± 5,8 / -- <sup>†</sup>	51,1 ± 3,7 / -- <sup>†</sup>	--	--
APC 1-101	DAB	82,1 ± 5,6 / -- <sup>†</sup>	38,8 ± 1,8 / -- <sup>†</sup>	--	--
APC 1-109	DAB	108,1 ± 2,8 / --	65,5 ± 1,2 / -- <sup>†</sup>	--	--
APC 1-111	DAB	77,3 ± 5,7 / -- <sup>†</sup>	44,4 ± 3,2 / -- <sup>†</sup>	--	--
APC 1-113	DAB	92,7 ± 1,8 / --	89,5 ± 3,6 / --	--	--
APC 1-115	DAB	75,9 ± 3,4 / --	69,0 ± 6,3 / --	--	--
APC 1-117	DAB	96,1 ± 6,6 / --	71,4 ± 6,1 / --	--	--
APC 1-119	DAB	96,9 ± 3,6 / --	55,5 ± 1,8 / -- <sup>†</sup>	--	--
APC 1-121	DAB	111,2 ± 5,4 / --	91,1 ± 4,8 / --	--	--
APC 1-122	DAB	110,0 ± 6,0 / --	91,6 ± 3,6 / --	--	--
APC 1-123	DAB	100,0 ± 3,8 / --	86,0 ± 5,5 / --	--	--
<b>Origen:</b> Mag. Esteban Panozzo, IQUIR, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina.					
EAP 1-5 (I)	DAB	105,5 ± 4,7 / --	78,3 ± 3,6 / --	--	--
EAP 1-9	DAB	83,6 ± 3,8 / --	74,9 ± 4,1 / --	--	--
EAP 1-11	DAB	89,1 ± 7,4 / --	77,2 ± 4,5 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 1-37	DAB	74,5 ± 8,0 / -- <sup>†</sup>	56,8 ± 5,6 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 1-39	DAB	101,5 ± 0,6 / --	85,7 ± 2,0 / --	--	--
EAP 1-41	DAB	89,7 ± 5,1 / --	86,5 ± 3,8 / --	--	--
EAP 1-43	DAB	80,9 ± 7,4 / --	69,7 ± 3,0 / --	--	--
EAP 1-45	DAB	85,2 ± 3,9 / --	78,4 ± 0,6 / --	--	--
EAP 1-46	DAB	90,3 ± 1,0 / --	73,4 ± 1,7 / --	--	--
EAP 1-47	DAB	98,1 ± 6,6 / -- <sup>†</sup>	48,9 ± 4,2 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 1-49	DAB	86,0 ± 6,8 / --	91,8 ± 5,1 / --	--	--
EAP 1-51	DAB	81,3 ± 1,6 / --	81,0 ± 7,5 / --	--	--
EAP 1-53	DAB	87,2 ± 5,1 / -- <sup>†</sup>	63,9 ± 4,1 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 1-55	DAB	70,7 ± 2,1 / --	61,8 ± 4,8 / --	--	--
EAP 1-57	DAB	90,4 ± 7,1 / --	62,6 ± 3,6 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 1-63	DAB	74,6 ± 3,0 / --	52,5 ± 2,8 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 1-67	DAB	71,3 ± 6,8 / -- <sup>†</sup>	57,6 ± 1,6 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 1-69	DAB	78,9 ± 5,2 / -- <sup>†</sup>	81,4 ± 5,6 / -- <sup>†</sup>	--	--
EAP 220AA	DA	101,6 ± 2,3 / --	105,5 ± 4,2 / --	--	--
EAP 220CA	DA	100,3 ± 9,7 / --	98,4 ± 7,8 / --	--	--
EAP 1147CA	DA	104,1 ± 5,0 / --	97,3 ± 5,3 / --	--	--
<b>Origen:</b> Dr. Steven Burgess, Design Medix, Portland, Estados Unidos.					
DM 1005	ND	--	--	19,1 ± 4,8 / --	--
DM 1015	ND	--	--	0 / 0,9 ± 0,1	- 8
DM 1025	ND	--	--	1,1 ± 0,9 / 3,8 ± 0,7	+ 5
DM 1026	ND	--	--	70,4 ± 7,6 / --	--
DM 1030	ND	--	--	26,4 ± 1,1 / --	--

DM 1035	ND	--	--	1,1 ± 0,5 / 1,8 ± 0,1	+ 6
DM 1120	ND	--	--	0 / 0,8 ± 0,1	- 3
DM 1166	ND	--	--	33,3 ± 6,9 / --	--
DM 1178	ND	--	--	24,3 ± 3,9 / --	--
DM 1180	ND	--	--	0 / 2,60 ± 0,03	+ 1
DM 1215	ND	--	--	0 / 0,46 ± 0,03	- 4
DM 1223	ND	--	--	6,5 ± 2,8 / --	--
DM 1252	ND	--	--	45,5 ± 3,5 / --	--
DM 1253	ND	--	--	27,4 ± 2,0 / --	--
DM 1257	ND	--	--	0,3 ± 0,3 / 1,8 ± 0,3	- 7
DM 1260	ND	--	--	0 / 0,62 ± 0,17	- 5
DM 1269	ND	--	--	37,5 ± 0,6 / --	--
DM 1270	ND	--	--	16,8 ± 6,5 / --	--
DM 1273	ND	--	--	0 / 4,1 ± 1,3	- 1
DM 1280	ND	--	--	67,1 ± 5,4 / --	--
DM 1293	ND	--	--	73,2 ± 8,1 / --	--
DM 1298	ND	--	--	0 / ~ 1,41	- 9
FR 3	ND	--	--	33,1 ± 3,1 / --	--
GR 3	ND	--	--	55,7 ± 0,2 / --	--
PL 06	ND	--	--	0 / 0,81 ± 0,15	0
PL 07	ND	--	--	0 / 0,49 ± 0,08	- 3
PL 08	ND	--	--	0 / 0,57 ± 0,05	- 5
PL 13	ND	--	--	0 / ~ 0,71	0
PL 48	ND	--	--	3,7 ± 1,3 / 2,6 ± 0,3	- 12
PL 91	ND	--	--	24,4 ± 5,3 / --	--
PL 106	ND	--	--	39,1 ± 2,5 / --	--
PL 228	ND	--	--	2,3 ± 0,3 / --	- 21
PL 229	ND	--	--	26,9 ± 0,7 / --	--
PL 241	ND	--	--	0 / --	--
PL 299	ND	--	--	4,1 ± 2,7 / 3,3 ± 0,6	- 3
PL 300	ND	--	--	14,2 ± 1,0 / --	--
T 2	ND	--	--	30,3 ± 4,2 / --	--
T 3.5	ND	--	--	47,1 ± 4,0 / --	--
T 13	ND	--	--	65,0 ± 1,8 / --	--
T 16.5	ND	--	--	0 / ~ 0,47	- 8
<b>Origen:</b> Dra. Helena Castro, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad de Porto, Portugal.					
FS554	AI (P)	56,0 ± 3,2 / -- <sup>†</sup>	-- / ~ 75 <sup>†</sup>	--	--
Mol 2008	AI (P)	41,0 ± 6,0 / -- <sup>†</sup>	-- / ~ 30 <sup>†</sup>	--	--
<b>Origen:</b> Prof. Dr. Tomas Schmidt					
Schmidt 1	SL	103,6 ± 5,2 / --	--	--	--
Schmidt 2	SL	101,2 ± 5,9 / --	--	--	--
Schmidt 3	SL	103,4 ± 7,3 / --	--	--	--
<b>Origen:</b> Dr. Conrad Kunick, Instituto de Medicina y Química Farmacéutica, Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania.					
KuRK 19	AI (P)	108,3 ± 7,0 / --	106,8 ± 6,7 / --	12,9 ± 0,4 / --	+ 24
KuRK 21	AI (P)	105,7 ± 5,0 / --	98,0 ± 3,1 / --	14,2 ± 3,2 / --	+ 34

KuRK 45	AI (P)	102,5 ± 7,6 / --	105,0 ± 7,4 / --	77,8 ± 4,5 / --	+ 11
KuRK 50	AI (P)	101,6 ± 4,3 / --	91,4 ± 5,5 / --	21,4 ± 2,0 / --	+ 9
KuRK 60	AI (P)	96,1 ± 4,8 / --	82,9 ± 4,0 / --	5,1 ± 0,2 / ~ 1	+ 99
KuRK 93	AI (P)	--	87,8 ± 6,0 / --	102,2 ± 8,4 / --	+ 21
KuRK 107	AI (P)	--	102,6 ± 1,6 / --	1,2 ± 0,5 / 0,13 ± 0,01	+ 47
KuRK 114	AI (P)	--	86,6 ± 8,6 / --	0,8 ± 0,2 / 0,11 ± 0,01	+ 28
KuRK 118	AI (P)	--	116,4 ± 6,8 / -- ‡	61,2 ± 8,1 / --	- 2
KuRK 130	AI (AZ)	--	103,9 ± 9,1 / --	4,0 ± 0,6 / 1,09 ± 0,32	- 2
KuRK 174	AI (P)	--	70,2 ± 5,5 / --	2,6 ± 0,6 / 0,17 ± 0,03	+ 15
KuRK 197	AI (P)	--	91,7 ± 5,8 / --	4,1 ± 0,0 / 0,5 - 1	+ 48
KuRK 221	AI (P)	--	45,2 ± 4,1 / -- †	1,9 ± 0,4 / 0,04 ± 0,02	+ 34
KuRK 249	AI (P)	--	81,3 ± 1,9 / --	0,8 ± 0,1 / 0,31 ± 0,08	+ 14
KuRK 256	AI (P)	--	71,7 ± 3,2 / --	5,5 ± 0,2 / 0,5 - 1	+ 48
KuRK 258	AI (P)	--	72,7 ± 5,9 / --	35,4 ± 0,4 / --	+ 42
KuRK 259	AI (P)	--	50,2 ± 3,8 / -- †	4,3 ± 4,0 / 0,43 ± 0,21	- 7
KuRK 268	AI (P)	--	47,6 ± 7,0 / -- †	13,9 ± 2,2 / --	- 9
KuRK 269	AI (P)	--	68,4 ± 6,0 / --	19,4 ± 0,1 / --	- 34
KuRK 270	AI (P)	--	80,1 ± 2,5 / --	2,2 ± 0,1 / 0,5 - 1	+ 30
KuRK 278	AI (P)	--	95,7 ± 3,8 / --	14,0 ± 2,6 / --	- 30
KuRK 279	AI (P)	--	90,2 ± 2,8 / --	3,9 ± 0,4 / ~ 2	+ 36
KuMai 056	AI (AZ)	89,0 ± 4,8 / --	99,1 ± 2,3 / --	86,7 ± 8,4 / --	- 6
KuMai 100	AI (AZ)	--	104,1 ± 9,0 / --	67,6 ± 5,8 / --	- 52
KuMai 104	AI (AZ)	105,1 ± 3,3 / --	107,0 ± 8,9 / --	19,3 ± 5,2 / --	+ 39
KuMai 116	AI (AZ)	67,2 ± 8,6 / --	100,5 ± 7,6 / --	36,7 ± 2,2 / --	- 7
KuMai 121	AI (AZ)	--	97,4 ± 7,4 / --	88,1 ± 2,2 / --	- 25
KuMai 138Z	AI (AZ)	--	97,2 ± 7,7 / --	54,3 ± 13,4 / --	- 37
KuMai 148	AI (AZ)	--	96,3 ± 7,1 / --	67,2 ± 1,8 / --	- 51
KuMai 149	AI (AZ)	--	98,7 ± 3,6 / --	91,3 ± 6,2 / --	- 54
KuMai 158	AI (AZ)	--	111,7 ± 8,1 / --	61,3 ± 18,5 / --	- 40
KuMai 163	AI (AZ)	--	101,8 ± 7,1 / --	92,0 ± 11,6 / --	- 41
KuMai 176	AI (AZ)	--	96,7 ± 6,1 / --	72,1 ± 7,6 / --	- 47
KuMai 209	AI (AZ)	--	61,9 ± 6,4 / --	54,0 ± 3,1 / --	+ 18
KuMai 334	AI (AZ)	--	96,1 ± 8,8 / --	82,3 ± 24,7 / --	+ 25
KuMai 336EE	AI (AZ)	--	91,5 ± 5,2 / --	22,1 ± 0,6 / --	+ 32
KuMai 339	AI (AZ)	--	63,8 ± 7,8 / --	88,9 ± 2,6 / --	+ 62
KuMai 348EE	AI (AZ)	--	67,5 ± 4,2 / --	12,1 ± 4,4 / --	+ 78
KuMai 351	AI (AZ)	--	79,8 ± 5,7 / --	38,4 ± 2,7 / --	+ 73
KuMai 358EE	AI (AZ)	--	68,1 ± 2,4 / --	1,2 ± 0,1 / ~ 2,5	+ 102
KuMai 360EE	AI (AZ)	--	94,6 ± 2,7 / --	7,8 ± 1,5 / 0,12 ± 0,04	+ 23
KuMai 361He	AI (AZ)	--	81,8 ± 5,5 / --	7,3 ± 0,9 / 0,45 ± 0,12	+ 2
KuMai 362	AI (AZ)	--	102,0 ± 8,3 / --	81,6 ± 3,9 / --	+ 26
KuMai 372EE	AI (AZ)	--	91,1 ± 7,2 / --	3,9 ± 0,3 / 0,18 ± 0,02	+ 24
KuMai 380	AI (AZ)	--	77,6 ± 5,4 / --	44,5 ± 2,7 / --	+ 85
KuMai 381	AI (AZ)	--	80,4 ± 3,1 / --	79,9 ± 10,5 / --	+ 2
KuMai 385	AI (AZ)	--	92,2 ± 4,9 / --	48,1 ± 4,6 / --	+ 55

KuMai 403	AI (AZ)	--	91,3 ± 5,6 / --	64,7 ± 2,3 / --	+ 21
KuMai 405	AI (AZ)	--	100,0 ± 1,1 / --	64,7 ± 6,8 / --	+ 19
KuMai 409	AI (AZ)	--	90,2 ± 3,8 / --	21,9 ± 0,1 / --	+ 45
KuMai 410He	AI (AZ)	--	73,2 ± 7,8 / --	74,6 ± 7,3 / --	+ 8
KuMai 422	AI (AZ)	--	84,2 ± 1,1 / --	75,0 ± 1,4 / --	+ 53
KuMai 423	AI (P)	--	91,2 ± 7,5 / --	2,5 ± 0,2 / 0,14 ± 0,07	+ 28
<b>Origen:</b> Dra. Lucija Peterlin Masic, Facultad de Farmacia, Universidad de Ljubljana, Eslovenia.					
ZEA 3	APPDA	-- / 4,3 ± 2,9 <sup>†</sup>	85,5 ± 2,9 / --	81,2 ± 16,1 / --	--
ZEA 5	APPDA	-- / 4,4 ± 0,7 <sup>†</sup>	99,1 ± 5,0 / --	88,5 ± 6,5 / --	--
ZEA 8	APPDA	-- / 22,1 ± 4,9 <sup>†</sup>	77,3 ± 3,1 / --	--	--
ZEA 10	APPDA	78,1 ± 2,3 / --	51,3 ± 2,8 / -- <sup>†</sup>	--	--
ZEA 34	APPDA	89,4 ± 3,8 / --	83,4 ± 4,6 / --	--	--
ZEA 35	APPDA	82,0 ± 5,9 / --	75,7 ± 6,1 / --	--	--
ZEA 40	APPDA	75,6 ± 9,2 / --	74,7 ± 5,2 / --	--	--
ZEA 41	APPDA	81,3 ± 9,1 / --	79,1 ± 4,4 / --	--	--
ZVR 100	APPDA	10,0 ± 2,2 / -- <sup>†</sup>	77,3 ± 4,8 / --	--	--
ZVR 102	AOCA	68,8 ± 5,3 / --	97,3 ± 5,6 / --	--	--
ZVR 103	AOCA	69,3 ± 7,8 / --	82,4 ± 4,7 / --	--	--
ZVR 105	APPDA	46,0 ± 4,5 / -- <sup>†</sup>	90,5 ± 4,5 / --	--	--
ZVR 106	APPDA	67,9 ± 5,0 / --	75,1 ± 5,4 / --	--	--
ZVR 107	APPDA	-- / 5,2 ± 0,5 <sup>†</sup>	88,9 ± 5,0 / --	69,5 ± 6,9 / --	--
ZVR 108	APPDA	32,1 ± 3,4 / -- <sup>†</sup>	118,4 ± 8,0 / -- <sup>‡</sup>	--	--
ZVR 110	APPDA	81,4 ± 4,1 / --	93,8 ± 5,8 / --	--	--
ZVR 111	APPDA	62,1 ± 4,6 / --	92,3 ± 2,9 / --	--	--
ZVR 113	AOCA	48,6 ± 3,5 / -- <sup>†</sup>	99,6 ± 6,2 / --	--	--
ZVR 117	N,N-dibencil-1-etil-3-metil-1H-pirazol-5-carboxamida	98,4 ± 4,6 / --	91,8 ± 5,8 / --	--	--
ZVR 119	2-amino-N,N-dibencil-4-metiliazol-5-carboxamida	99,2 ± 3,0 / --	94,3 ± 3,2 / --	--	--
ZVR 130	APPDA	107,2 ± 3,3 / --	96,5 ± 3,2 / --	--	--
ZVR 131	APPDA	100,6 ± 5,4 / --	89,2 ± 5,0 / --	--	--
ZVR 132	APPDA	64,0 ± 1,8 / --	75,8 ± 4,6 / --	--	--
ZVR 133	APPDA	104,0 ± 2,7 / --	69,8 ± 4,2 / --	--	--
ZVR 134	APPDA	84,1 ± 5,1 / --	89,1 ± 1,3 / --	--	--
ZVR 135	APPDA	100,8 ± 2,5 / --	88,4 ± 2,0 / --	--	--
ZVR 140	APPDA	-- / 3,7 ± 0,5 <sup>†</sup>	78,4 ± 5,6 / --	65,6 ± 4,5 / --	--
ZVR 141	APPDA	55,7 ± 4,7 / --	89,3 ± 7,8 / --	--	--
ZVR 150	APPDA	33,1 ± 4,1 / -- <sup>†</sup>	84,7 ± 5,4 / --	--	--
ZVR 151	APPDA	95,7 ± 1,9 / --	92,0 ± 8,5 / --	--	--
ZVR 152	APPDA	116,1 ± 6,6 / -- <sup>‡</sup>	93,8 ± 4,0 / --	--	--
ZVR 156	APPDA	100,0 ± 6,5 / --	84,2 ± 6,4 / --	--	--
ZVR 157	APPDA	-- / 7,5 ± 1,2 <sup>†</sup>	80,6 ± 6,0 / --	56,1 ± 9,9 / --	--
ZVR 158	APPDA	86,8 ± 2,7 / --	63,5 ± 5,7 / --	--	--

ZVR 159	APPDA	79,6 ± 2,2 / --	81,3 ± 1,6 / --	--	--
ZVR 160	APPDA	34,6 ± 2,4 / -- <sup>†</sup>	79,2 ± 2,5 / --	--	--
ZVR 163	APPDA	87,3 ± 5,2 / --	92,0 ± 5,7 / --	--	--
ZVR 165	APPDA	24,6 ± 9,5 / -- <sup>‡</sup>	66,6 ± 4,0 / --	--	--
ZVR 167	APPDA	76,0 ± 4,5 / --	80,0 ± 5,0 / --	--	--
ZVR 175	APPDA	88,3 ± 2,4 / --	71,5 ± 6,0 / --	--	--
<b>Origen:</b> Dr. Tomaz Solmajer, Instituto Nacional de Química, Ljubljana, Slovenia.					
T6057697	N-(1-(1H-indazol-3-carbonil)piperidin-4-il)metan sulfonamida	101,2 ± 4,9 / --	--	--	--
<b>Origen:</b> Dra. Anastasia Detsi, National Hellenic Research Foundation, Atenas, Grecia.					
AD 81	BBHPP	-- / 9,0 ± 1,5 <sup>†</sup>	128,2 ± 3,6 / -- <sup>†</sup>	-- / 13,3 ± 3,3	--
AD 82	BBHPP	94,4 ± 11,3 / --	107,7 ± 6,4 / --	--	--
AD 83	BBHPP	97,8 ± 4,7 / --	106,9 ± 4,7 / --	--	--
AD 84	BBHPP	-- / 4,1 ± 0,8 <sup>†</sup>	119,0 ± 6,3 / -- <sup>†</sup>	-- / ~ 23	--
AD 85	BBHPP	104,2 ± 5,8 / --	102,9 ± 6,1 / --	--	--
<b>Origen:</b> Dra. Theodora Calogeropoulou, National Hellenic Research Foundation, Atenas, Grecia					
ADMRC 150	BBHPP	5,4 ± 1,3 / -- <sup>‡</sup>	101,4 ± 8,2 / --	11,4 ± 1,1 / --	--
ADMRC 151	BBHPP	53,8 ± 4,8 / -- <sup>‡</sup>	107,7 ± 6,1 / --	--	--
ADMRC 152	BBHPP	58,9 ± 4,7 / -- <sup>‡</sup>	115,4 ± 4,3 / -- <sup>‡</sup>	--	--
ADMRC 153	BBHPP	77,3 ± 1,8 / --	103,3 ± 3,2 / --	--	--
ADMRC 154	BBHPP	9,3 ± 1,5 / -- <sup>‡</sup>	110,3 ± 8,7 / --	27,2 ± 1,2 / --	--
ADMRC 155	BBHPP	86,9 ± 7,2 / --	97,5 ± 3,4 / --	--	--
ADMRC 156	BBHPP	51,2 ± 4,9 / -- <sup>‡</sup>	108,1 ± 6,5 / --	--	--
ADMRC 157	BBHPP	83,8 ± 4,0 / --	102,1 ± 0,01 / --	--	--
ADMRC 158	BBHPP	36,3 ± 3,5 / -- <sup>‡</sup>	119,1 ± 4,6 / -- <sup>†</sup>	--	--
ADMRC 159	BBHPP	50,9 ± 4,7 / -- <sup>‡</sup>	91,7 ± 6,5 / --	--	--
ADKPN 160	BBHPP	27,8 ± 2,3 / -- <sup>‡</sup>	116,4 ± 4,2 / -- <sup>†</sup>	--	--
ADKPN 161	BBHPP	20,2 ± 2,5 / -- <sup>‡</sup>	126,7 ± 0,8 / -- <sup>†</sup>	--	--
ADKPN 162	BBHPP	91,7 ± 0,6 / --	82,0 ± 1,6 / --	--	--
ADKPN 163	BBHPP	73,0 ± 4,7 / --	88,0 ± 5,0 / --	--	--
ADKPN 164	BBHPP	22,7 ± 1,6 / -- <sup>‡</sup>	123,2 ± 7,0 / -- <sup>†</sup>	--	--
ADKPN 165	BBHPP	4,4 ± 2,7 / -- <sup>‡</sup>	123,6 ± 9,1 / -- <sup>†</sup>	51,7 ± 1,5 / --	--
PZBAS	(R)-2-hidroxi-3-(4-(2-hidroxietil)ciclohexil)propano-1-ácido sulfónico	96,7 ± 3,7 / --	78,7 ± 3,7 / --	--	--
TC 220	TP	109,2 ± 2,9 / --	98,0 ± 7,7 / --	--	--
TC 221	TP	108,8 ± 8,5 / --	93,5 ± 3,8 / --	--	--
TC 222	TP	107,0 ± 4,4 / --	97,7 ± 8,7 / --	--	--
TC 223	TP	108,3 ± 6,6 / --	98,2 ± 9,7 / --	--	--
TC 224	TP	108,4 ± 8,9 / --	94,5 ± 4,0 / --	--	--
TC 225	TP	99,2 ± 5,2 / --	92,3 ± 1,8 / --	--	--

TC 226	PD	97,2 ± 5,0 / --	83,9 ± 7,1 / --	--	--
TC 227	PD	127,7 ± 13 / -- <sup>†</sup>	102,0 ± 2,3 / --	--	--
TC 230	TP	105,6 ± 6,1 / --	73,8 ± 8,4 / --	--	--
TC 231	TP	105,2 ± 7,7 / --	87,2 ± 4,0 / --	--	--
TC 232	TP	106,1 ± 4,1 / --	100,2 ± 8,1 / --	--	--
TC 233	TP	98,9 ± 4,7 / --	104,2 ± 9,6 / --	--	--
TC 234	TP	105,1 ± 10,5 / --	112,1 ± 4,7 / --	--	--
TC 235	TP	102,1 ± 6,7 / --	100,9 ± 4,9 / --	--	--
TC 236	TP	130,1 ± 5,6 / -- <sup>†</sup>	78,7 ± 4,3 / --	--	--
<b>Origen:</b> Dr. Jonas Sarlauskas, Departamento de Bioquímica de Xenobióticos, Universidad de Vilnius, Lituania.					
JOSHA 01	NFPQ	96,0 ± 1,9 / --	83,9 ± 5,2 / --	--	--
JOSHA 02	NFPQ	86,7 ± 4,6 / --	96,9 ± 6,4 / --	-- / 3,5 ± 0,5	--
JOSHA 03	NFPQ	91,8 ± 2,2 / --	86,6 ± 5,3 / --	--	--
JOSHA 04	NFPQ	90,6 ± 8,3 / --	91,5 ± 6,1 / --	--	--
JOSHA 05	NFPQ	105,0 ± 3,7 / --	99,4 ± 6,0 / --	--	--
JOSHA 06	NFPQ	93,4 ± 5,3 / --	100,2 ± 4,7 / --	-- / 4,2 ± 1,2	--
JOSHA 07	NFPQ	87,1 ± 5,7 / --	90,4 ± 9,7 / --	-- / 1,7 ± 0,1	--
JOSHA 08	NF	86,0 ± 2,9 / --	77,3 ± 3,6 / --	--	--
JOSHA 09	BF	90,9 ± 3,0 / --	91,5 ± 9,9 / --	--	--
JOSHA 10	BF	90,5 ± 3,6 / --	92,7 ± 3,4 / --	--	--
JOSHA 11	BF	101,4 ± 7,1 / --	88,8 ± 5,8 / --	-- / 18,0 ± 3,7	--
JOSHA 12	BF	99,7 ± 0,9 / --	92,7 ± 2,7 / --	-- / 14,2 ± 9,5	--
JOSHA 13	BF	101,0 ± 1,9 / --	88,9 ± 2,7 / --	-- / 4,6 ± 0,2	--
JOSHA 14	BF	88,3 ± 5,3 / --	93,1 ± 5,6 / --	--	--
JOSHA 15	BF	87,6 ± 1,7 / --	88,4 ± 8,2 / --	-- / 11,8 ± 2,0	--
JOSHA 16	BF	89,2 ± 7,6 / --	92,6 ± 4,9 / --	-- / 1,24 ± 0,04	--
JOSHA 17	BF	93,3 ± 3,7 / --	89,2 ± 6,4 / --	--	--
JOSHA 18	BF	111,5 ± 14,5 / --	92,7 ± 5,9 / --	--	--
JOSHA 19	BF	95,9 ± 2,4 / --	99,6 ± 5,8 / --	--	--
JOSHA 20	BF	86,5 ± 7,5 / --	118,8 ± 2,4 / -- <sup>†</sup>	-- / 13,3 ± 3,3	--
JOSHA 21	BF	80,6 ± 5,9 / --	112,2 ± 4,8 / --	--	--
JOSHA 22	BF	97,6 ± 7,4 / --	111,2 ± 6,5 / --	--	--
JOSHA 23	BF	97,2 ± 7,2 / --	108,4 ± 0,9 / --	--	--
JOSHA 24	BF	96,7 ± 7,3 / --	102,7 ± 7,2 / --	81,2 ± 6,3 / > 240	--
JOSHA 25	BF	100,5 ± 9,7 / --	98,4 ± 4,2 / --	48,5 ± 1,0 / 15,1 ± 1,4	--
JOSHA 26	BF	--	104,9 ± 5,7 / --	56,0 ± 5,7 / --	--
JOSHA 27	BF	--	98,2 ± 5,6 / --	60,9 ± 4,9 / --	--
JOSHA 28	ND	--	91,6 ± 4,9 / --	20,6 ± 1,8 / --	--
JOSHA 29	ND	--	93,8 ± 5,4 / --	35,2 ± 0,1 / --	--
JOSHA 30	ND	--	91,8 ± 3,3 / --	24,0 ± 2,3 / --	+ 73
JOSHA 32	ND	--	93,4 ± 4,5 / --	48,9 ± 0,3 / --	--
JOSHA 33	ND	--	96,5 ± 6,3 / --	80,7 ± 2,5 / --	--
JOSHA 34	ND	--	90,9 ± 5,9 / --	53,6 ± 5,1 / --	--
JOSHA 35	ND	--	106,4 ± 1,1 / --	77,6 ± 8,0 / --	--
JOSHA 36	ND	--	106,1 ± 2,5 / --	60,1 ± 6,9 / --	--

JOSHA 37	ND	--	86,3 ± 2,2 / --	25,8 ± 1,6 / --	--
JOSHA 38	ND	--	91,1 ± 0,7 / --	17,7 ± 0,5 / --	+ 73
JOSHA 39	ND	--	88,4 ± 2,7 / --	23,9 ± 0,5 / --	--
JOSHA 40	ND	--	85,0 ± 1,4 / --	52,1 ± 15,2 / --	--
JOSHA 41	ND	--	90,7 ± 7,2 / --	56,6 ± 2,5 / --	--
JOSHA 42	ND	--	92,2 ± 5,1 / --	10,3 ± 2,8 / --	--
JOSHA 43	ND	--	89,7 ± 5,8 / --	84,8 ± 1,8 / --	--
<b>Origen:</b> Reactivos de uso comercial (Sigma-Aldrich).					
Epiandrosterona	(3S,5S,8R,9S,10S,13S,14S)-3-hidroxi-10,13-dimetil-tetradecahidro-2H-ciclopenta[a]fenantren-17(14H)-ona	--	--	82,7 ± 0,8 / --	--
Prochlorperazine	2-cloro-10-(3-(4-metilpiperazin-1-il)propil)-10H-fenotiazina	57,8 ± 7,5 / -- **	72,5 ± 6,4 / -- *	--	--

### Leyenda:

La nomenclatura abreviada para los núcleos estructurales es la siguiente: **ND**, información no disponible; **NF**, derivado de 2-nitrofurano; **DAB**, derivado de una diamina N,N'-bis(bencil)-sustituida y **DA** derivado de diamina; **AI**, derivado de 4,5-dihidroazepino[4,5-b]indol-2(1H,3H,6H)-ona; **AI (P)**, significa que es una paulona y **AI (AZ)** que es una azapaulona; **SL**, derivado de una lactona de sesquiterpeno; **APPDA**, derivado de 6-arilpirido[2,3-d]pirimidin-2,7-diamina; **AOCA**, derivado de 2-aminoxazol-5-carboxamida; **BBHPP**, derivado de 1-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-benzoil-3-hidroxi-5-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona; **TP**, derivado de tieno[2,3-d]pirimidin-4(3H)-ona; **PD**, derivados de P, 1H-purina-2,6(3H,7H)-diona; **NFPQ**, derivado de 2-(3-(5-nitrofurano-2-il)propil)quinolina; **BF**, derivado de benzo[c][1,2,5]oxadiazol N-óxido o benzofuroxano.

\* La "Intensidad GFP" se calcula como  $I_{GFP} = IFR_{\text{compuesto}} - IFR_{c+}$  siendo IFR la intensidad de fluorescencia relativa calculada como  $IFR = [(I_c/I_{c-}) * 100] - 100$  donde  $I_c$  es la intensidad de fluorescencia del compuesto (o control positivo de inducción sin tratamiento con compuesto simbolizado como  $c_+$ ) e  $I_{c-}$  es la intensidad de fluorescencia del control negativo no tratado y no inducido.

El símbolo <sup>†</sup> significa que el compuesto interfiere con el ensayo pero dicha interferencia fue corregida. El símbolo <sup>‡</sup> indica que se sabe que el compuesto interfiere pero no se ha corregido la interferencia en los resultados informados en la tabla.

El compuesto con el símbolo \* fue evaluado a 300 µM.