

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

**Enfermedad de Chagas: Identificación del factor de virulencia TcMIP
como posible objetivo en el desarrollo de fármacos mediante RMN**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL
GRADO DE BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
QUÍMICA**

AUTOR:

Marcelo Cevallos Lira

ASESOR:

Dr. Juan Manuel López Smith

Lima, Julio, 2020

RESUMEN

Las enfermedades tropicales desatendidas son un grupo de patologías que suelen afectar a los sectores menos privilegiados de la población, y pese a que comprometen gravemente la salud de los afectados y pueden llegar a ser mortales, no se les otorga la importancia debida. Hecho que se traduce en un desconocimiento general sobre las mismas y en falta de tratamientos efectivos. La enfermedad de Chagas, que pertenece a esta categoría, es una patología endémica de América causada por el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), la cual se caracteriza por graves afecciones cardíacas; sin embargo, pese a que estadísticamente causa más perjuicios que la malaria y el dengue juntos, carece de tratamientos eficaces en su etapa crónica. En la búsqueda de nuevos fármacos se han identificado diferentes factores de virulencia del *T. cruzi*, dentro de los cuales destaca la proteína TcMIP (Potenciador de Infectividad de macrófagos de *T. cruzi*, según sus siglas en español), la cual es producida en el estadio infeccioso del tripanosoma y cuya inhibición repercute negativamente en su capacidad infecciosa. En esta tesis proponemos establecer un punto de partida que facilite la implementación de una metodología de cribado molecular *in vitro* con TcMIP, en busca de potenciales inhibidores de esta proteína que permitan desarrollar fármacos para combatir el Mal de Chagas. Para ello se abordarán técnicas basadas en RMN, como STD, waterLOGSY y CSP, las cuales, además de proporcionar parámetros termodinámicos y cinéticos, permiten obtener información estructural clave que facilitará un diseño de fármacos más eficiente.



AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por el sacrificio y amor incondicional

A mi padre por apoyarme siempre en todo

A mis profesores y a mi asesor por formarme en el camino de la ciencia



TABLA DE CONTENIDOS

1	Introducción.....	1
2	Enfermedad de Chagas.....	3
2.1	Epidemiología: población de riesgo.....	3
2.2	Etiología.....	5
2.2.1	Vectores epidemiológicos.....	5
2.2.2	Patógeno: <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.3	Patología.....	9
2.3.1	Etapa aguda.....	9
2.3.2	Etapa crónica.....	10
2.4	Diagnóstico.....	12
2.4.1	Diagnóstico en la etapa aguda.....	12
2.4.2	Diagnóstico en la etapa crónica.....	12
2.5	Tratamientos actuales.....	13
2.5.1	Benznidazol y nifurtimox.....	13
2.5.1.1	Mecanismo de acción	15
2.6	TcMIP como un nuevo blanco terapéutico.....	18
2.6.1	Estructura.....	18
2.6.2	Mecanismos de acción.....	21
2.6.2.1	Mecanismo catalítico.....	21
2.6.2.2	Mecanismo no-catalítico.....	25
2.6.3	Actividad infecciosa.....	27
3	Cribado molecular mediante RMN para el desarrollo de fármacos.....	29
3.1	K_{ex} y velocidades de intercambio	30
3.2	Métodos basados en el ligando.....	31
3.2.1	Efecto Nuclear Overhauser (NOE).....	31
3.2.2	Diferencia de transferencia de saturación (STD).....	35
3.2.3	WaterLOGSY.....	38
3.3	Métodos basados en la proteína.....	40
3.3.1	CSP (perturbación del desplazamiento químico).....	41
3.3.1.1	Determinación de K_D	43
3.4	Relación estructura-afinidad mediante RMN (SAR by NMR).....	44
4	Conclusiones.....	49
5	Bibliografía.....	51

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1	Distribución de casos de enfermedad de Chagas según la OMS 2006-2015.....	3
Imagen 2	Ejemplo de espécimen de <i>Triatoma brasiliensis</i>	5
Imagen 3	Distribución geográfica de triatominos en Perú.....	6
Imagen 4	Vivienda rural susceptible a ser infestada de triatominos.....	7
Imagen 5	Estadíos replicativos e infecciosos del <i>T. cruzi</i>	8
Imagen 6	Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Imagen 7	Paciente joven con el signo de Romaña en el ojo derecho, vista frontal y lateral.....	10
Imagen 8	Nifurtimox y Benznidazol.....	13
Imagen 9	Esquema de reacción general entre el grupo nitro y las NTRs del tipo I.....	15
Imagen 10	Mecanismo de activación del NFX.....	16
Imagen 11	Mecanismo de activación del BZN.....	17
Imagen 12	Estructura de TcMIP.....	19
Imagen 13	Superposición de parte del bolsillo hidrofóbico en diferentes MIP's, de entre las cuales se observan: TcMIP (cian), FKBP12 (amarillo), LpMIP (rojo).....	20
Imagen 14	Espectro ¹ H- ¹⁵ N HSQC de TcMIP a 800 MHz asignado.....	21
Imagen 15	Isomerización <i>cis/trans</i> de un enlace X-Pro.....	22
Imagen 16	Estructura de FK506.....	23
Imagen 17	Posible estructura del estado de transición en la isomerización de enlaces proil.....	24
Imagen 18	Medición de la infección de bacterias Lp en células NCI-H292 y NCI-H292/MEC.....	25
Imagen 19	Estructura de la rapamicina (izquierda) e interacción entre FKBP12, rapamicina y mTOR mediante su dominio FRB.....	26
Imagen 20	FKBP12 unida a unidad TβR-1 mediante el dominio GS.....	27
Imagen 21	Diferentes casos de comparación entre K_{ex} y ΔV	30
Imagen 22	Representación esquemática de los parámetros de distancia y orientación, los cuales influyen en el acoplamiento dipolar.....	31
Imagen 23	Diagrama de energía de un sistema de dos espines acoplados dipolarmente.....	33
Imagen 24	Espectros NOESY y tr-NOESY cuando la molécula se encuentra libre y ligada a la proteína...	35
Imagen 25	Visualización esquemática del principio de la STD y de los espectros obtenidos.....	36
Imagen 26	Experimento STD entre serina albúmina humana y dos presuntos ligandos 6-CH ₃ -Trp y 7CH ₃ -Trp.....	37
Imagen 27	Gráfico A _{STD} vs [L] para el experimento de serina albúmina con 6-CH ₃ -Trp.....	37
Imagen 28	Visualización esquemática de los principales mecanismos de transferencia de magnetización en el experimento waterLOGSY, así como el espectro obtenido.....	39
Imagen 29	(a) Espectro RMN del ácido benzoico. (b) Espectro RMN de la glucosa. (c) Espectro de una solución de ácido benzoico, glucosa y serina albúmina humana. (d) Espectro obtenido del espectro waterLOGSY de la solución c.....	40
Imagen 30	Interacción entre Ras.Mg ²⁺ .GppNHp con Raf-RBD, en rojo se muestran los residuos que interaccionaron y en amarillo los falsos positivos. A la izquierda se muestran los valores reales y a la derecha los calculados en base a σ	42
Imagen 31	(a) Vista esquemática de la superposición de espectros a diferentes concentraciones. (b) Gráfico $\Delta\delta$ vs [L] de diferentes pares proteína-ligando.....	43
Imagen 32	Visión esquemática de la síntesis de ligandos mediante SAR by NMR.....	45
Imagen 33	Representación esquemática entre ligando y proteína marcada con ¹³ C y ¹⁵ N.....	46
Imagen 34	Visualización esquemática de experimento INPHARMA.....	46

Imagen 35 Visualización esquemática de experimento SAR by ILOEs..... 47
Imagen 36 Diferentes métodos utilizados por Shuker *et al.* para la síntesis de un inhibidor de FKBP12. 48



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Valor de DALYs de algunas enfermedades en América.....	4
Tabla 2	ADRs comunes debido al tratamiento con BZN.....	14
Tabla 3	Eficacia de la terapia tripanocida con BZN según diferentes métodos.....	14
Tabla 4	Algunos factores de virulencia identificados de <i>T. cruzi</i>	18
Tabla 5	Residuos de FKBP12 que interactúan con FK506 y equivalentes en TcMIP.....	23
Tabla 6	Resumen de las propiedades del ligando en función de su estado libre o enlazado.....	34
Tabla 7	Resumen de las técnicas de estudio de interacción proteína-ligando mediante RMN propuestas.....	44



ABREVIATURAS

(IFN)-γ	Interferón gamma o inmunitario
(TNF)-α	Factor de necrosis tumoral alfa
ADRs	Reacciones adversas a los fármacos (<i>Adverse drug reactions</i>)
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BZN	Benznidazol
ChHD	Cardiomiopatías chagásicas (<i>Chagas heart disease</i>)
DALY	Años de vida ajustados por discapacidad (<i>Disability Adjusted Life Years</i>)
DNAK	ADN de cinetoplasto (<i>Kinetoplast DNA</i>)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FK506	Tracolimus ($C_{44}H_{69}NO_{12}$)
FKBP	Proteínas que se unen al compuesto FK506
HeLa	Linaje celular de Henrietta Lacks
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina G
IHA	Hemaglutinación indirecta
INPHARMA	NOE Interligando para el Mapeo Farmacológico (<i>Interligand NOE for Pharmacophore Mapping</i>)
ITC	Calorimetría Isotérmica de Titulación (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
K_a	Constante de absorción
K_D	Constante de equilibrio de disociación
K_{ex}	Constante de intercambio
K_{off}	Constante cinética de disociación
K_{on}	Constante cinética de asociación
L-685,818	18-Hidroxiascomicina ($C_{43}H_{69}NO_{13}$)
LAMP	Ampliación isotérmica mediante bucle
LLC-MK2	Células epiteliales de riñón de mono Rhesus
LpMIP	Potenciador de Infectividad Macrófaga de <i>L. pneumophila</i>
MEC	Matriz extracelular
MIP	Potenciador de Infectividad de Macrófagos (<i>Macrophage Infectivity Potentiator</i>)
MST	Termoforesis a Microescala (<i>Microscale Thermophoresis</i>)
mTOR	Objetivo de Rapamicina en mamíferos (<i>mammalian Target of Rapamycin</i>)
NCI-H292	Células de pulmón humano de carcinoma mucoepidermoide
NFX	Nifurtimox
NOE	Efecto Nuclear Overhauser (<i>Nuclear Overhauser Effect</i>)
NOESY	Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser (<i>NOE Spectroscopy</i>)
NTD	Enfermedades Tropicales Desatendidas (<i>Neglected Tropical Diseases</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción de Cadena de Polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PPI o PPIasa	Peptidil Prolil <i>cis/trans</i> Isomerasa

RMN	Resonancia Magnética Nuclear (<i>NMR</i>)
SAR by ILOEs	Relación Estructura-Afinidad mediante efecto NOE Interligando (<i>Structure–Activity Relationship by Interligand NOE</i>)
SAR by NMR	Relación Estructura-Afinidad mediante RMN (<i>Structure–Activity Relationship by NMR</i>)
SPR	Resonancia Plasmónica de Superficie (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
STD	Diferencia de Transferencia de Saturación (<i>Saturation Transfer Difference</i>)
TcMIP	Potenciador de Infectividad Macrófaga de <i>T. cruzi</i>
WaterLOGSY	Observación de Agua-Ligando mediante Gradiente de Espectroscopía (<i>Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy</i>)
τ_c	Tiempo de correlación rotacional
HSQC	Correlación Cuántica Única Heteronuclear (<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)



1. Introducción

Probablemente, uno de los aspectos más importantes que ha permitido que la humanidad prospere como civilización sea el relacionado a la salud, tanto en el desarrollo de tratamientos y curas frente a diversas enfermedades, como en la prevención de las mismas. En este sentido, resulta razonable que ciertas patologías demanden mayor atención debido a su alta peligrosidad, mayor capacidad de contagio, u otros factores. Lamentablemente, en pleno siglo XXI existe un buen número de enfermedades que, pese a que afectan a un porcentaje relativamente alto de personas y comprometen gravemente su salud, no son debidamente atendidas por las autoridades ni por la comunidad científica, como es el caso de las enfermedades tropicales desatendidas (NTD, por sus siglas en inglés).

Existen 19 enfermedades categorizadas como NTDs según la OMS, las cuales se estima que afectan a más de mil millones de personas a nivel mundial. Sin embargo, en 2013 entre todas ellas solo ocasionaron alrededor de 142000 muertes, dado que dichas enfermedades no se caracterizan por una alta mortalidad.¹ Por el contrario, comprometen progresivamente la salud de las víctimas, privándolas de poder desarrollar sus actividades cotidianas. Por este motivo resulta más adecuado analizarlas en base a sus Años de Vida Ajustados por Discapacidad (DALY, por sus siglas en inglés), el cual es una medida de años de vida potencialmente perdidos debido a muerte prematura o a discapacidad producida por la enfermedad. En este sentido, en 2016, las NTDs ocasionaron una pérdida de más de 15 millones de DALYs[¥], lo que equivale al 30% de los DALYs ocasionados por la tuberculosis.²

Las NTDs son causadas por diferentes agentes patológicos, siendo la mayoría de carácter parasitario, incluyendo helmintos (principalmente nemátodos), protistas como tripanosomas o leishmanias y adicionalmente virus, bacterias y micobacterias (como *Mycobacterium leprae*, responsable de la lepra).³ El carácter tropical de dichas enfermedades no solo se basa en las condiciones favorables para el desarrollo de dichos organismos, sino también en el hecho de que un gran porcentaje de la población considerada pobre se ubica en zonas tropicales cercanas al ecuador, principalmente en África, Centroamérica, Sudamérica y ciertas zonas de Asia. Inclusive, no es de extrañar que una persona en estas regiones padezca más de una NTD a la vez.^{3,4}

El factor de pobreza al que están asociadas las NTDs es una de las causas más fuertes del contagio y al mismo tiempo de la falta de interés en las mismas. En primer lugar, la escasez de recursos conlleva a un pobre o nulo acceso a servicios básicos, como agua o desagüe, permitiendo a los parásitos sobrevivir hasta alcanzar la madurez sexual (ya que algunos poseen largos ciclos de vida), de ahí el estigma de que las enfermedades parasitarias sean un sinónimo de pobreza.⁵ Adicionalmente, algunas de estas enfermedades requieren de cierto tiempo para que el parásito pueda poner en peligro la vida del huésped. Y dado que las personas de este sector socioeconómico presentan preocupaciones tangibles a corto plazo y suelen subsistir el “día a día”, no buscan atención médica hasta que se encuentran en una fase realmente grave.

[¥] No se ha tomado en cuenta la helmintiasis transmitida por suelos por falta de información actual, pero podrían incrementar enormemente el valor de DALYs de las NTDs

En segundo lugar, los bajos recursos de los infectados les impiden acceder a los costosos tratamientos (si es que existen), al mismo tiempo que desaniman a las empresas farmacéuticas a desarrollar mejores medicamentos por no ser un público rentable. Sumado a ello, las malas gestiones públicas de salud, así como el bajo presupuesto que poseen los países afectados ocasionan trabas en el desarrollo de tratamientos efectivos.⁶ Afortunadamente, en los últimos años, el interés de la comunidad científica por ciertas NTDs parece ir en aumento, lo que supone un rayo de esperanza para los afectados.

Una de las enfermedades desatendidas más prevalentes en América Latina es la enfermedad de Chagas (también conocida como tripanosomiasis americana), la cual es endémica de la región. La OMS estima que aproximadamente 7 millones de personas padecen esta enfermedad, y se calcula que causa la muerte de más de 7 000 personas al año.⁷ El patógeno responsable de ésta es el *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), un protozoo que actúa como parásito, produciendo principalmente afecciones cardíacas que en la fase crónica pueden derivar en insuficiencia cardíaca permanente e incluso la muerte del paciente.⁸

Pese a que la enfermedad ha sido descubierta hace más de 100 años, solo existen dos medicamentos disponibles para combatirla, Benznidazol y Nifurtimox, los cuales poseen un alto grado de ineficacia, largos periodos de tratamiento y efectos secundarios nocivos.⁹⁻¹¹ Debido a ello, resulta necesario el desarrollo de nuevos compuestos que puedan combatir la enfermedad eficazmente sin afectar la salud del paciente. Uno de los medios para lograr este objetivo es el desarrollo de compuestos que inhiban selectivamente proteínas necesarias para el tripanosoma, ya sean de carácter vital o las que utiliza para permanecer como huésped (factores de virulencia). De esta manera, o se mata directamente al parásito; o se afectan sus habilidades de movilidad, inmunosupresión, inmunoevasión, capacidad de conseguir alimento, entre otras, lo cual termina causando su muerte.

Para poder detectar la interacción entre moléculas, en este caso entre el inhibidor y la proteína, existe un amplio catálogo de métodos, como por ejemplo, la Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR), la Termoforesis a Microescala (MST), la Calorimetría Isotérmica de Titulación (ITC), y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), entre otros.¹² Sin embargo, lo que hace particularmente útil al RMN es que nos permite detectar simultáneamente tanto información estructural, con resolución atómica, como la cuantificación de dicha interacción.¹³ Es decir, permite corroborar exactamente qué átomos de una molécula están interaccionando y, adicionalmente, nos proporciona información sobre su afinidad. En este sentido, una de las técnicas más utilizadas es el SAR by NMR, lo que en español quiere decir “Relación Estructura-Afinidad mediante RMN”. A parte de lo ya mencionado, esta técnica también cuenta con beneficios adicionales, como su gran versatilidad y el hecho de que no requiere fijar a la proteína sobre una superficie sólida, por lo que no se resta libertad de movimiento ni se altera su estructura.¹² En este trabajo se expondrá sobre la enfermedad de Chagas y se explicarán metodologías mediante RMN que pueden ser útiles en el desarrollo de nuevos fármacos.

2. Enfermedad de Chagas

2.1. Epidemiología: Población de riesgo

Endémica de América Latina, la enfermedad de Chagas fue diagnosticada por primera vez en 1909 en Brasil, por el Dr. Carlos Chagas. Sin embargo, su existencia se remonta hasta tiempos prehomínidos.¹⁴ Incluso, como dato histórico, se sospecha que Charles Darwin la contrajo en uno de sus viajes a Sudamérica.⁹ Actualmente se estima que entre 6 y 7 millones de personas padecen esta tripanosomiasis, la cual se cobra 7 000 vidas anuales.⁷ La mayor cantidad de afectados se encuentran repartidos entre Centroamérica y Sudamérica, con un total de 21 países infectados (imagen 1), los cuales concentran 5,7 millones de casos. Es decir, aproximadamente entre el 80 y 90% de casos reportados ocurren en esta región.^{14,15} Esta enfermedad representa un grave problema en el continente americano y debería ser tratada de manera prioritaria, ya que en el 2016 su valor en DALYs en la región fue de 250 893. Dicho valor, a pesar de no igualar a la enfermedad isquémica del corazón (la cual lidera las estadísticas), supera a muchas enfermedades, incluyendo a la malaria y dengue juntos (tabla 1).²

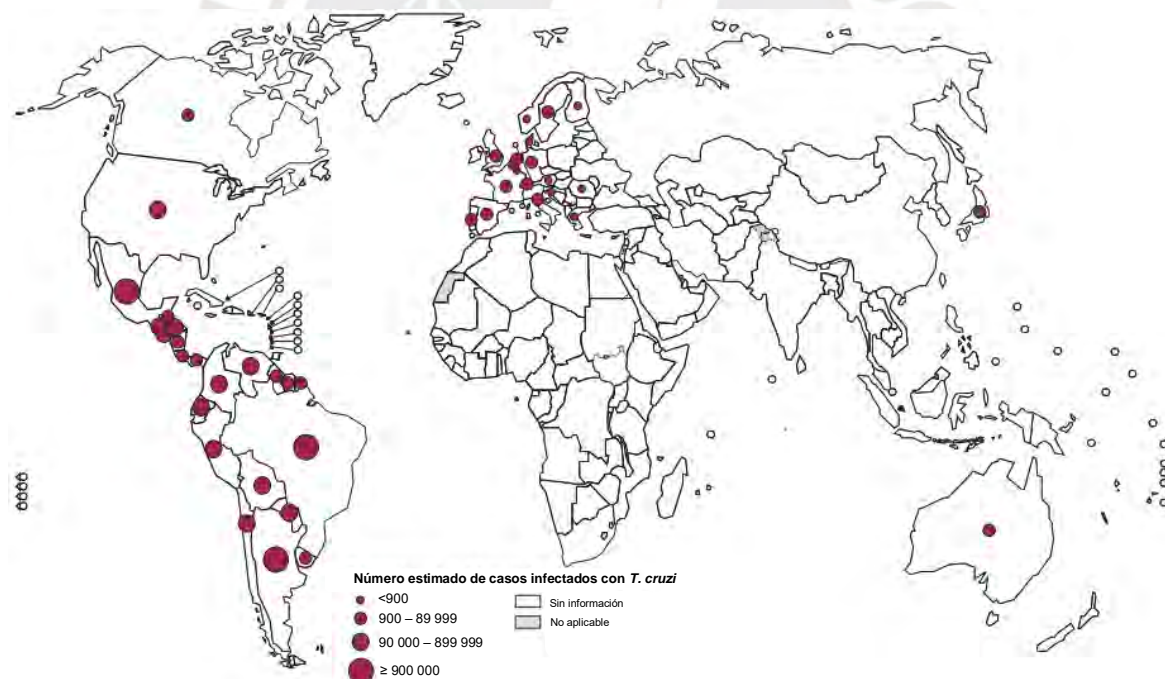


Imagen 1: Distribución de casos de enfermedad de Chagas según la OMS 2006-2015 (Adaptado).¹⁵

Como se ha mencionado anteriormente, el gran responsable de la proliferación de la enfermedad, sobre todo en el sector latinoamericano, es el componente de pobreza y toda la connotación que ésta incluye. Factores como la ausencia de centros médicos capacitados, escasez de pruebas para la detección de la enfermedad, falta de conciencia sobre la importancia de realizarse chequeos médicos regularmente y el hecho de que la propia enfermedad se mantiene asintomática durante prolongados intervalos de años,

deriva en que muchos infectados ni siquiera sean conscientes de su enfermedad hasta que llegan a una etapa crónica. Debido a esto, el número de infectados podría ser mayor al estimado. Incluso, en 2015, se determinó que el 80% de la población afectada carece de recursos suficientes para acceder al diagnóstico y tratamiento necesario.¹⁶ Adicionalmente, la enfermedad de Chagas presenta un carácter zoonótico, por lo que el ambiente rural en el que se desenvuelven dichas personas, que implica la cercanía de animales domésticos, representa un reservorio de tripanosomas que pueden ser transmitidos a personas mediante ciertos vectores epidemiológicos.¹⁷ Sin embargo, debido a la migración de estos sectores de la población hacia las ciudades en búsqueda de mejores condiciones, se ha ocasionado una fuerte presencia de la enfermedad en ambientes urbanos.

La migración de las poblaciones marginales no se limita al mismo país de procedencia. Se sabe que un gran porcentaje de población latinoamericana se ve en la necesidad de abandonar su país natal en busca de mejores condiciones de vida. En este sentido, la cantidad de inmigrantes de procedencia latina ha aumentado de 26 millones en el 2000 a 40,46 millones en 2019 (incremento de 78,7%), de los cuales, en 2019, 4,98 millones tuvieron como destino Europa y 26,58, Norteamérica.^{18,19} Dicha migración ha favorecido el transporte del tripanosoma hacia dichas regiones no endémicas.

El contagio de esta enfermedad no se debe solo a los vectores epidemiológicos, o la ingestión de alimentos contaminados con el tripanosoma. Una persona infectada puede contagiar a otra mediante transfusión de sangre, donación de órganos e incluso puede ser congénita, en el caso que el parásito atraviese la placenta e infecte al niño en pleno periodo de embarazo. Estos métodos de contagio favorecen la proliferación (aunque de manera lenta) de la enfermedad una vez que los infectados han migrado de las zonas endémicas. Debido a todos estos factores, se estima que el número de personas en riesgo debido a esta enfermedad es de 75 millones a nivel mundial.¹⁵

Tabla 1: Valor de DALYs de algunas enfermedades en América (OMS, 2016) ²

Enfermedad o causa	DALYs (2016)
Enfermedad isquémica del corazón	22 097 270
Cáncer de mama	3 094 845
VIH/SIDA	2 975 771
Tuberculosis	721 223
Enfermedad de Chagas	250 893
Hepatitis (A, B, C, E)	221 251
Dengue	202 727
Cáncer de tiroides	169 076
Cáncer testicular	157 270
Desastres naturales	99 158
Malaria	32 024

2.2. Etiología

El agente responsable de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*, un protozoo del género *Trypanosoma*. Este protista necesita de vectores epidemiológicos que puedan transportarlo directamente al huésped, en este caso, triatominos. Es decir que, como muchas enfermedades, se necesitan tres actores: el patógeno, el vector y el huésped.

2.2.1. Vectores epidemiológicos.

Los triatominos (imagen 2) son insectos clasificados en el orden *Hemiptera*, pertenecientes a la familia *Reduviidae*. Existen cinco tribus de triatominos, las cuales se derivan en 146 especies. La gran mayoría de estas habitan en Centroamérica y Sudamérica, donde son conocidos por diferentes nombres dependiendo del país. Por ejemplo, son llamadas chirimachas en Perú, chinche besucona en México y Centroamérica, barbeiro en Brasil, entre otros.²⁰

En términos generales, los triatominos prefieren hábitats selváticos con temperaturas de entre 24 y 28°C y una humedad en el aire entre 30 y 80%, por lo que se han adaptado perfectamente a las selvas tropicales de América Latina. No obstante, también soportan climas más fríos, como la Patagonia, en donde se mantienen en estado letárgico durante los crudos inviernos. Sin embargo, el hábitat de estos insectos se extiende a otras regiones. Siete de estas especies se encuentran en Australia y la zona sureste del continente asiático. Mientras que *Triatoma rubrofasciata* es la única especie que habita en prácticamente todos los trópicos.²¹ Particularmente, en Perú se concentran alrededor de 20 especies de triatominos, distribuidos como se muestra en la imagen 3.²²



Imagen 2: Ejemplo de espécimen de *Triatoma brasiliensis*.²³

El ciclo de vida de estos insectos incluye cinco etapas ninfales antes de llegar a la adultez, en donde todas las etapas son potencialmente transmisoras de la enfermedad de Chagas ya que son de carácter hematófago, alimentándose principalmente de mamíferos y aves, aunque en algunos casos también lo hacen de reptiles y otros artrópodos.²¹ Es importante destacar que la infección del tripanosoma no es congénita para los triatominos, por lo que para convertirse en vectores deberán infectarse primero de la sangre de algún organismo del cual se alimentan.²¹



Imagen 3: Distribución geográfica de triatominos en Perú según el Ministerio de Salud del Perú (2005). (Adaptado).²²

El mecanismo de transporte del patógeno por parte de los insectos no es tan evidente, ya que no se debe específicamente a la picadura del triatomino. Cuando el insecto se alimenta de su víctima (usualmente de noche), éste se hincha considerablemente y siente la necesidad de defecar. Dependiendo de la especie esta acción puede ocurrir simultáneamente, luego de haberse saciado o mucho después, lejos del huésped. La transmisión de la enfermedad se da cuando los tripanosomas, presentes en las heces, ingresan al huésped a través de los orificios de las picaduras o mediante aberturas como los ojos, boca, etc.^{14,21}

Todas las especies de triatominos son vectores potenciales de tripanosomas, aunque no necesariamente de *T. cruzi* (el patógeno de la enfermedad de Chagas), como es el caso de la ya mencionada *Triatoma rubrofasciata*, quien transmite a otras especies de tripanosomas, como *T. lewisi* y *T. conorhini*.²⁴ Las especies más importantes como portadores de la enfermedad de Chagas en América son *T. infestans*, *T. brasiliensis* Neiva, *T. dimidiata*, *Panstrongylus megistus*, y *Rhodnius prolixus*. Esto se debe a su gran adaptación a ambientes poblados por humanos, ya que muchas de las construcciones de zonas rurales poseen techos de esteras y paredes de barro o adobe propensos a servir de refugio para los insectos, como se observa en la imagen 4.^{21,25}



Imagen 4: Vivienda rural susceptible a ser infestada de triatominos.²⁵

2.1.2. Patógeno: *Trypanosoma cruzi*.

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo unicelular flagelado de la familia *Trypanosomatidae*, que pertenece al orden *Kinetoplastea*.²⁶ Dependiendo de sus variaciones genéticas presenta 7 subtipos (TcI –TcVII).²⁷ Los miembros de este orden se caracterizan por poseer un cinetoplasto, el cual es una masa de ADN extranuclear (DNAk) que se ubica en la única mitocondria que poseen. Esta forma de ADN es una de las más raras e interesantes, y puede constituir hasta el 25% del total del ADN del organismo.^{26,28}

El ciclo de vida del *T. cruzi* es bastante complejo (imagen 5), ya que implica la infección de dos huéspedes para poder completarse: el vector epidemiológico (triatominos) y el huésped mamífero. En cada uno de ellos transcurrirán dos etapas o estadíos, uno infectivo y otro replicativo. Es importante mencionar que las funciones de ambas fases son excluyentes. Es decir, en estadío reproductivo carece de capacidad infecciosa hacia otros individuos, y viceversa.^{28,29}

Estadíos replicativos:

Amastigote: Ocurre en el huésped animal, posee una forma esferoidal y no se aprecia al flagelo externamente. Es común en toda la familia *Trypanosomatidae* (imagen 5A).

Epimastigote: Ocurre en el vector invertebrado. En esta fase, el tripanosoma lleva a cabo su reproducción en el intestino del triatmino. Se caracteriza por tener al cinetoplasto en la parte anterior al núcleo y porque el flagelo presenta la forma de una membrana ondulante (imagen 5E).

Estadío Infeccioso:

Tripomastigote: Exclusivo de los tripanosomas, suele medir entre 20 y 25 μm . Se caracteriza por presentar un núcleo vesiculoso ubicado en la parte central y un flagelo que recorre toda la célula hasta salir por el extremo posterior, opuesto a la ubicación del cinetoplasto (Imagen 5F). Se subdivide en dos, la forma metacíclica es la que infecta humanos y mamíferos, mientras que la

sanguínea es la forma que adquiere en los vasos sanguíneos y es la que infecta al vector cuando se alimenta de un animal o persona infectado.

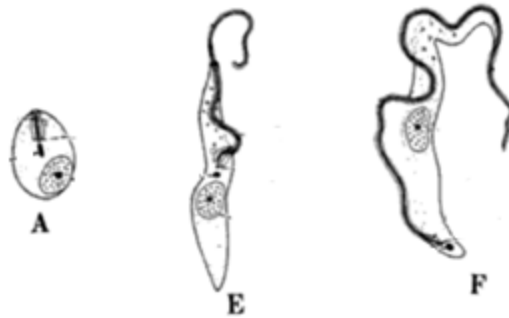


Imagen 5: Estadíos replicativos e infecciosos del *T. cruzi*. (Modificado de Olsen).²⁹

Como se puede apreciar en la imagen 6, el ciclo comienza cuando el tripanosoma infecta a un insecto vector. En esta etapa, el parásito se encontrará en un estadio de tripomastigote sanguíneo (6a). Una vez que llegue a su intestino pasará a la forma epimastigote, reproduciéndose (6b). Posteriormente, el parásito en forma de tripomastigote metacíclico se posiciona en la parte distal del intestino del triatomino, siendo expulsado con las heces del insecto (6c). En esta forma ingresa a las células del mamífero (6d), en donde pasa al estadio amastigote y se reproduce (6e). Una vez que la cantidad de amastigotes es considerable, la célula se rompe y los tripanosomas son liberados en forma de tripomastigotes sanguíneos, quienes viajarán por el torrente sanguíneo hacia otras zonas del cuerpo e infectarán otras células, regresando a su etapa amastigote (6f). El ciclo del tripanosoma se completa cuando un insecto triatomino se infecta con los tripomastigotes sanguíneos de animales infectados de los que se alimenta (6g).²⁸

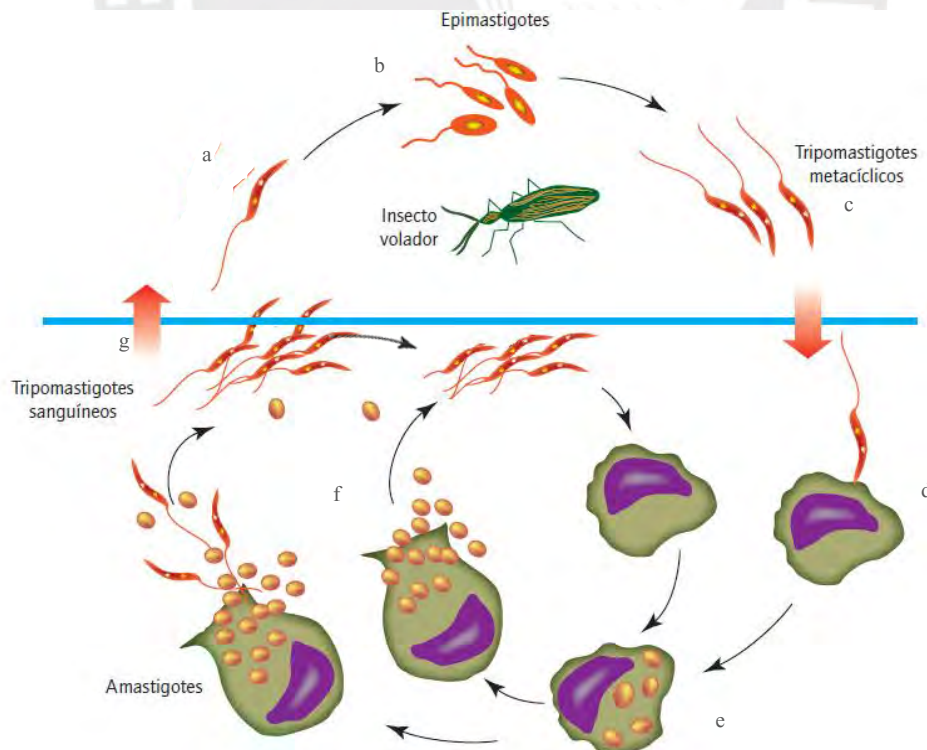


Imagen 6: Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* (Modificado de Zavala).²⁸

T. cruzi es capaz de infestar una gran variedad de organismos y, en condiciones normales en mamíferos, es capaz de desarrollarse en adipocitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, musculares, cardiomiocitos y células nerviosas. Sin embargo, se ha demostrado en laboratorio que el tripanosoma puede infectar prácticamente cualquier tipo de célula. Adicionalmente posee una gran capacidad para movilizarse a través de la matriz extracelular y puede interactuar con colágeno, laminina, trombospondina, fibronectina y proteoglicanos. Lamentablemente, el mecanismo de infección del tripanosoma aún no ha sido dilucidado. No obstante, se sabe que debe estar dotado de una gran versatilidad, así como de capacidades inmunoevasivas y autosupresoras.³⁰

2.3. Patología

Actualmente se reconocen dos etapas clínicas de la enfermedad: aguda y crónica, las cuales son descritas a continuación.

2.3.1. Etapa Aguda.

Una vez que el tripomastigote metacíclico ha ingresado al organismo animal, la enfermedad pasará por un periodo de incubación variable, dependiendo de la vía por la que el protozoo haya ingresado. Si la transmisión se dio por vía vectorial (picadura del triatomino), este periodo durará de 7 a 15 días, si fue de manera oral (por el consumo de alimentos infectados), de 2 a 22 días. Y finalmente, si el contagio fue mediante transfusión sanguínea (de otra persona infectada), puede tardar de 8 a 112 días.³¹

Una vez pasado este periodo, la fase aguda puede durar de 6 a 8 semanas y en algunos casos puede darse de manera asintomática. La sintomatología de esta enfermedad es diversa y puede confundirse fácilmente con otras. Los síntomas más comunes pueden incluir:^{28,32}

- Chagoma de inoculación: Nódulos inflamatorios agudos localizados en el sitio de la picadura del triatomino. Cuando ocurre alrededor de la conjuntiva se denomina “signo de Romaña” (imagen 7), en el cual la zona afectada adquiere un color rojo-púrpura y se caracteriza por la aparición de un edema, eritema, linfadenopatía, dacrioadenitis y eritema conjuntival acompañado de secreción. Todos estos síntomas suelen desaparecer al cabo de uno o dos meses. Adicionalmente, también se pueden presentar chagomas hematógenos, los cuales se dan de manera subcutánea.
- Fiebre: Probablemente el síntoma más común, suele tener valores altos y puede llegar hasta los 41 grados.
- Hepatoesplenomegalia: Aumento de tamaño considerable del hígado o bazo.
- Edema: Se hace más evidente en la cara, extremidades y testículos.

- Afecciones cardiacas: En algunos casos se pueden presentar arritmias y taquicardias, incluso, mialgia y miocarditis.
- Adinamia y astenia: Ocasionalmente ocasionan cansancio y pérdida de fuerzas en los infectados
- Otros síntomas: Vómitos, diarrea y dolores musculares

En el caso que la enfermedad haya sido transmitida de manera oral, se tiene evidencia de una sintomatología más agresiva. La razón podría estar asociada con la posibilidad del ingreso de una mayor cantidad de tripanosomas (debido a que la persona consumiría todo el conjunto de heces del triatomino). O, por otro lado, a una mayor facilidad para el parásito de penetrar la mucosa gástrica.³³

Diversos autores establecen diferentes cifras de mortalidad en esta etapa de la enfermedad. A pesar de ello, esta no es muy elevada y puede variar entre el 1 y 10%.^{31,32,34,35} La población más afectada suele ser la infantil, ya que presentan un cuadro más intenso, que puede llegar a incluir meningoencefalitis, la cual es sumamente peligrosa y potencialmente mortal.²⁸ Luego de transcurridas las ocho semanas, los síntomas descritos anteriormente desaparecen en gran medida, lo cual les hace creer a las personas que han sanado. Aunque en realidad, un porcentaje de ellas pasará a la etapa crónica.



Imagen 7: Paciente joven con el signo de Romaña en el ojo derecho, vista frontal y lateral.³²

2.3.2. Etapa crónica.

Se subdivide en dos etapas, una crónica intermedia, y una crónica.

Etapa crónica intermedia:

Se caracteriza, en primer lugar, por la poca carga parasitaria que puede ser encontrada en muestras sanguíneas del paciente, ya que la cantidad de estos parásitos en el huésped disminuye drásticamente a partir de la semana 4.³⁴ En segundo lugar, en la gran mayoría de casos es asintomática; sin embargo, en

caso de presentarse síntomas, estos serán de carácter cardiaco, como arritmia y taquicardia. La duración de esta etapa es bastante larga, ya que puede prolongarse durante 20 años.²⁸

Etapa crónica:

Es la fase que mayor riesgo supone para el paciente. Del total inicial de infectados, entre un 20 y 30% sufrirán de cardiomiopatías chagásicas (ChHD),³¹ un 6%, alteraciones digestivas severas y un 3%, afecciones neurológicas crónicas.²⁸ Es decir, aproximadamente más de un tercio de quienes superaron la fase aguda padecerán esta etapa. Se ha encontrado que, en países endémicos, un 8,1–28% del total de insuficiencias cardiacas se deben a la ChHD.³⁶ Estos problemas son progresivos y pueden resultar en el peor de los casos en muerte súbita.⁸ En términos generales, las afecciones que puede sufrir una persona en esta etapa son:^{31,35}

- Arritmias
- Tromboembolismo
- Aneurismas
- Ensanchamiento ventricular
- Insuficiencia cardiaca biventricular
- Bloqueos en la rama derecha del corazón
- Bloqueo fascicular anterior izquierdo
- Disfunción sinusal acompañada de bradicardia
- Muros trombales
- Muerte súbita

La causa del resurgimiento de la enfermedad en su etapa crónica (ChHD) aún está sujeta a debate, pero se sospecha que puede tener diferentes orígenes. En primer lugar, el más evidente sería el daño directo que los tripanosomas causan en el tejido cardiaco, debido a la lisis celular que se lleva a cabo en el proceso de reproducción.²⁸ Sin embargo, la carga parasitaria luego de la etapa aguda es notablemente menor, por lo que este factor podría tener más relevancia en dicha etapa. En segundo lugar, se postula que el daño sería causado principalmente en el tejido neurológico, donde el sistema parasimpático se vería comprometido, lo que ocasiona denervación cardiaca, despoblación neuronal, desarrollo de áreas disinérgicas en los ventrículos, entre otros.³⁷ Finalmente, se tiene evidencia del carácter autoinmune de la miocarditis. Cuando una persona es infectada por este parásito, el sistema inmune intenta combatirlo mediante diversos mecanismos. Uno de ellos implica la producción de (IFN)- γ y (TNF)- α por parte de los linfocitos T y linfocitos T citotóxicos. Si bien estas sustancias ayudan a controlar la enfermedad en la etapa aguda, debido a que algunas de las proteínas del protozoo comparten epítetos con sus huéspedes, luego de una larga exposición generarían una reacción autoinmune causante de la miocarditis. También se sospecha que las células B1, entre otros factores producirían efectos similares.³⁸ En síntesis, el desarrollo de una ChHD es bastante complejo y podría ser una combinación de todos los factores expuestos.^{31,38}

2.4. Diagnóstico

La mayoría de la sintomatología de esta enfermedad puede ser confundida con otras patologías, por lo que aplicar pruebas de diagnóstico a modo de descarte resulta ser lo ideal en zonas endémicas. Adicionalmente, sería recomendable que personas que convivan con quienes ya han dado positivo a las pruebas de detección, también se sometan a ellas, ya que podrían ser pacientes asintomáticos.

Debido a las marcadas diferencias en la etapa aguda y grave de la enfermedad, el método de diagnóstico debe ser distinto en ambas. Sin embargo, por obvias razones, resulta más beneficiosa la detección en la etapa aguda, pues disminuye el riesgo al que está sometido el paciente.

2.4.1. Diagnóstico en la etapa aguda.

La característica más distintiva de esta fase es la presencia de tripomastigotes sanguíneos en el huésped, por lo que la detección parasitológica resulta una buena estrategia de detección.

Históricamente, los métodos utilizados se basaban en la multiplicación del parásito. El más destacable y usado (incluso hasta hoy en día) es el xenodiagnóstico, que consiste en usar sangre del supuesto infectado para alimentar triatomíneos sanos. Luego, las heces de estos insectos serán monitoreadas periódicamente en un plazo de uno o hasta dos meses. Lamentablemente, luego de ese periodo de tiempo, la persona se encontrará en la etapa final de la etapa aguda, por lo que, para fines de diagnóstico no es la más recomendada.^{34,39}

Actualmente, el método más sencillo y simple, además de ser poco costoso, es el del frotis húmedo (*wet smear*). Consiste en esparcir una gota de sangre sobre un portaobjetos, cubrirlo y analizarlo mediante un microscopio (10x40) con el objetivo de observar a los tripanosomas. Sin embargo, requiere analizar un gran número de muestras por persona y puede dar resultados negativos en caso que el paciente recién se encuentre en una etapa muy temprana. De ser este el caso, debe recurrirse a métodos más sofisticados, como PCR (Reacción de Cadena de Polimerasa) o LAMP (Ampliación Isotérmica Mediante Bucle), los cuales permiten amplificar y detectar secciones reconocibles del ADN del parásito.³⁴

2.4.2. Diagnóstico en la etapa crónica.

En esta etapa, la concentración de parásitos en la sangre es tan baja que no resulta factible la detección directa, ni siquiera por amplificación, ya que cabe la posibilidad que al extraer muestras del paciente, no se capture ningún tripanosoma.³⁴ Es por ello que se emplean métodos indirectos, como pruebas serológicas, que permiten la detección de antígenos específicos. La OMS sugiere tres tipos de pruebas serológicas, de las cuales, si en dos de ellas se obtienen resultados positivos, resulta una prueba contundente de la condición de infectado del paciente.^{34,39}

Dichas pruebas son: Hemaglutinación Indirecta (IHA), Inmunofluorescencia Indirecta (IF indirecta) y ELISA. Las cuales están diseñadas para la detección de anticuerpos IgG y presentan alta sensibilidad. Sin embargo, su sensibilidad no es óptima, ya que pueden dar falsos positivos, como por ejemplo frente a *T. leishmania* (causante de la leishmaniasis) y *T. rangeli* (no patógeno).³⁹ La realización de electrocardiogramas también puede apoyar al diagnóstico. Sin embargo, en la etapa crónica intermedia la técnica presenta dificultades para distinguir entre pacientes sanos e infectados.³¹

2.5. Tratamientos actuales

En la actualidad existen solo dos medicamentos utilizados para combatir la enfermedad de Chagas, Benznidazol y Nifurtimox (imagen 8), dos compuestos nitroheterocíclicos que han estado disponibles en el mercado desde hace aproximadamente 50 años.⁴⁰ Actualmente existen solo dos farmacéuticas que producen Benznidazol, LAFEPE (Brasil) y Elea (Argentina), mientras que nifurtimox es producido solo por Bayer (aunque gracias a su compromiso con la OMS, puede adquirirse a través de esta organización).^{10,40}

Si bien son relativamente efectivos combatiendo al *T. cruzi* en la etapa aguda de la enfermedad, su aplicación en la etapa crónica dista de garantizar la recuperación del paciente y está sujeta a debate. Sumado a ello, la gran cantidad de efectos secundarios (Reacciones Adversas a los Fármacos, ADRs) a los que están expuestos sus consumidores, ocasiona que muchos de ellos no puedan completar el largo periodo de tratamiento.^{11,41,42}

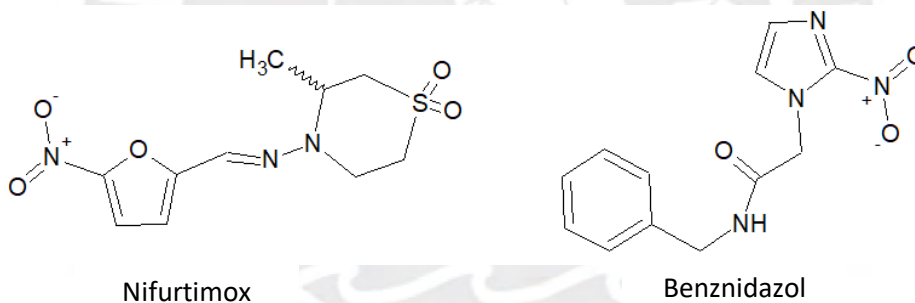


Imagen 8: Nifurtimox (izquierda) y Benznidazol (derecha)

2.5.1. Benznidazol y nifurtimox.

Benznidazol (BZN).

Es el medicamento más usado para combatir la enfermedad de Chagas. Suele recetarse en dosis de 5-10 mg/kg por día en adultos y 5-8 mg/kg al día en niños menores de 17 años durante un periodo total de entre 30 y 60 días.¹¹ En cuanto a aspectos farmacocinéticos, la absorción del medicamento en el intestino presenta una constante (K_a) de 1,14/h y un tiempo de vida media de 12 horas en adultos y 6 en niños.⁴⁰

Existe una gran lista de ADRs que pueden ser producidas a causa de este tratamiento, las más comunes se muestran en la tabla 2, donde las de carácter dermatológico suelen ser las más frecuentes.⁴² Sin embargo,

los casos más graves pueden incluir agranulocitosis (derivada de neutropenia), fiebre, septicemia y púrpura trombocitopénica (enfermedad hemorrágica caracterizada por la destrucción de plaquetas, sarpullido violáceo e incluso sangrado de las mucosas).⁴³

Tabla 2: ADRs comunes debido al tratamiento con Benznidazol.⁴²

Carácter	ADRs		
Dermatológico	•Erupciones •Angioedema	•Urticaria	•Comezón
Gastrointestinal	•Dolor epigástrico	•Inflamación y dolor abdominal	•Náuseas y vómitos
Malestar general	•Dolor de cabeza	•Adinamia	•Astenia
Hematológico	•Eosinofilia	•Linfocitosis	•Neutrofilia
Neurológico	•Desórdenes alimenticios •Parestesia	•Desórdenes de sueño •Polineuropatías	•Depresión
Hepáticos	•Incremento de niveles de ALT y AST		

Para poder determinar la eficacia del tratamiento es necesario hacerle un seguimiento prolongado al paciente que pueda garantizar la total eliminación de los tripanosomas. A lo largo de los años se han realizado diversos estudios con diferentes técnicas para este propósito, cuyos resultados en promedio se aprecian en la tabla 3.¹¹ Sin embargo, la relativa poca cantidad de estudios al respecto, sumado a la baja población muestral de pacientes, además de las diferencias en el método utilizado, duración del seguimiento y antigüedad de los estudios ocasionan que no exista información 100% precisa. Curiosamente, las pruebas serológicas no parecen ser útiles como criterio de cura debido a que continúan dando positivo en un intervalo de entre 3 y 10 años luego de haberse aplicado el tratamiento (muchos de los cuales terminan siendo falsos positivos).¹¹

Tabla 3: Eficacia de la terapia tripanocida con BZN según diferentes métodos¹¹

Método	Etapa Aguda		Etapa Crónica
	Niños	Adultos	Adultos
Parasitológico	95.5%	97.1%	72.8%
Basados en PCR	82.6%	86.1%	57.6%
Serológicos	61.7%	44.5%	15.2%

La etapa crónica de la enfermedad presenta los índices más bajos de eficacia. En uno de los estudios más completos, realizado en 2017 en Colombia, se evaluaron 224 pacientes en esta etapa.⁴² Se determinó que el 23,2 % de pacientes se vio obligado a abandonar el tratamiento debido a la intensidad de los efectos secundarios. Respecto al 76,8 % que sí logró completarlo, no se lograron disminuir ni revertir significativamente las afecciones cardíacas.⁴²

Nifurtimox (NFX).

Este medicamento resulta bastante similar al BZN en términos de dosis y ADRs. Suele recetarse entre 8 y 15 mg/kg por día en tres dosis por un periodo de tiempo de 60 días aproximadamente.⁴⁰ Muchos de los efectos secundarios que produce los comparte con el BZN. Sin embargo, a diferencia de éste, los síntomas más comunes no son los de carácter dermatológico, sino, neurológicos e incluyen vómitos, anorexia, pérdida de peso, irritabilidad, desórdenes de sueño, dolores de cabeza y polineuropatías.^{40,41} La absorción del medicamento en el intestino presenta un K_a de 0,8/h. Asimismo, el tiempo de vida media en el organismo es de 3 horas tanto en adultos como en niños y ambos valores resultan inferiores frente a BZN.⁴⁰ Debido a los factores farmacocinéticos, a la dificultad en tratar las complicaciones neurológicas y a evidencia genotóxica, el NFX cada vez resulta menos empleado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.¹¹ De hecho, actualmente no se prescribe en Brasil, Uruguay, Chile ni E.E.U.U.⁴⁴

A pesar de todas estas desventajas, se ha encontrado que el uso de NFX puede resultar efectivo y con un bajo porcentaje de ADRs en pacientes que previamente han tenido que abandonar el tratamiento con BZN debido a ADRs, por lo que podría ser utilizado como una segunda línea de tratamiento.⁴⁵

2.5.1.1. Mecanismo de acción.

Si bien el mecanismo de acción de ambos compuestos aún es motivo de estudio, se sabe que tanto Benznidazol como Nifurtimox están clasificados como profármacos, ya que adquieren su actividad citotóxica luego de ser activados por las nitroreductasas tripanosomales (NTRs).¹¹ Estas enzimas (NADH dependientes) se subdividen en dos categorías, I y II; y son esenciales en la capacidad infectiva de los tripanosomas, ya que mutantes creadas sin estas no pudieron diferenciarse en la etapa tripomastigote metacíclico, por lo que fueron incapaces de infectar células de mamíferos.⁴⁶

Actualmente se propone que son las del primer tipo las que reaccionan con el fármaco mediante dos pasos, donde cada uno involucra una transferencia de dos electrones.¹¹ Dichas reducciones afectan directamente al grupo nitro que presenta cada profármaco, convirtiéndolos en especies nitroso y posteriormente hidroxilamina, como se expresa de manera general en la imagen 9.⁴⁴

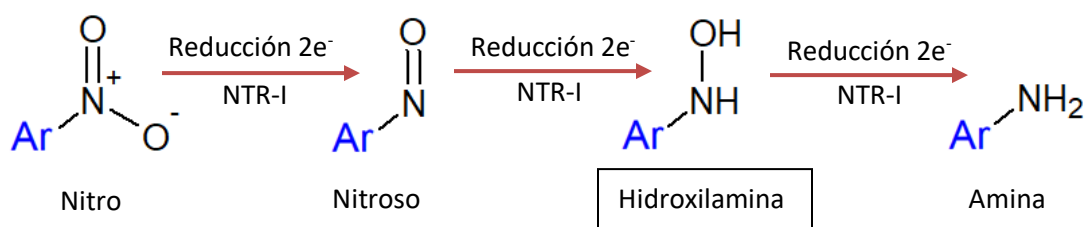


Imagen 9: Esquema de reacción general entre el grupo nitro y las NTRs del tipo I (Ar simboliza a un grupo aromático).

Una vez que en ambas especies se ha formado la hidroxilamina, proceden a reaccionar mediante mecanismos diferenciados. Para el NFX, en el paso c, imagen 10, ocurre la ruptura del furano y la eliminación de una molécula de agua, lo que da lugar a un nitrilo de cadena abierta. Los compuestos nitroso e hidroxilamina se encuentran en corchetes debido a que no han logrado ser aislados, aunque en teoría deberían formarse como intermediarios.⁴⁴

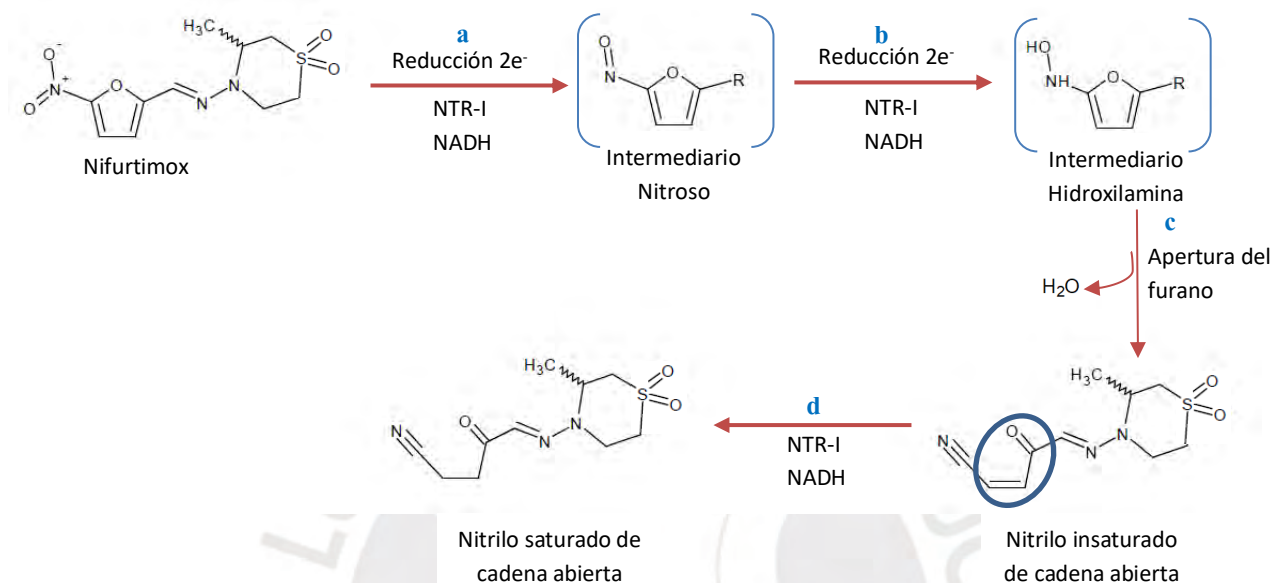


Imagen 10: Mecanismo de activación del NFX.⁴⁴

Se propone que el nitrilo es el responsable de la actividad tripanocida del compuesto, aunque el mecanismo no está bien definido. Lo que se sospecha es que el grupo carbonil α,β -insaturado actuaría como un aceptor de Michael (indicado por un círculo azul en la imagen 10), el cual puede formar enlaces de manera irreversible con los grupos sulfhidrilos de las cisteínas. De esta manera, inhibiría las enzimas en las que estos aminoácidos formen parte del sitio activo o cumpla una función indispensable, lo que podría explicar su toxicidad hacia células humanas.^{44,47} Adicionalmente, la NTR también pueden reducir el enlace doble $\alpha-\beta$ insaturado (imagen 10 d). Sin embargo, dicho producto no parece tener actividad tripanocida, lo que a su vez refuerza la idea de la inhibición vía adición de Michael.⁴⁴

En el caso de BZN (imagen 14), se puede notar que luego de las reacciones enzimáticas (a,b), en las cuales sí se ha logrado aislar a los intermediarios, la molécula sufre tres reacciones no enzimáticas (c, d, e). Estas reacciones dan como resultado la formación del 4,5-dihidro-4,5-dihidroimidazol (cuyos isómeros *cis* y *trans* han sido aislados). Lo interesante de este producto radica en el equilibrio en solución que posee con una molécula de glicoxal y un producto de guanidina (f).⁴⁴ El glicoxal es un dialdehído reactivo y peligroso para los organismos vivos gracias a su capacidad de formar aductos con moléculas como ADN, ARN, proteínas y tioles de bajo peso molecular.¹¹ El nucleótido más propenso a este tipo de reacciones es la guanina, con la cual se evidencia formación de enlaces cruzados, los cuales tendrán repercusiones negativas sobre la transcripción y replicación, impidiéndolas o induciendo a mutaciones.^{48,49} Adicionalmente, la formación de aductos glicoxal-tiol puede inhibir los mecanismos antioxidantes del

parásito, volviéndolo vulnerable al daño oxidativo.¹¹ No obstante, la formación del dialdehído es sumamente baja y no justifica por sí misma la eficacia del Benznidazol, por lo que aún deben realizarse más estudios.⁴⁹

Finalmente, no se descarta que los intermediarios nitroso e hidroxilamina puedan reaccionar con alguna proteína y causar inhibición. Incluso, bajo ciertas condiciones, la reducción de los fármacos podría darse gracias a NTRs del tipo II (como antiguamente se pensaba), lo cual generaría especies radicales sumamente tóxicas, tanto para el tripanosoma, como para células del huésped.¹¹

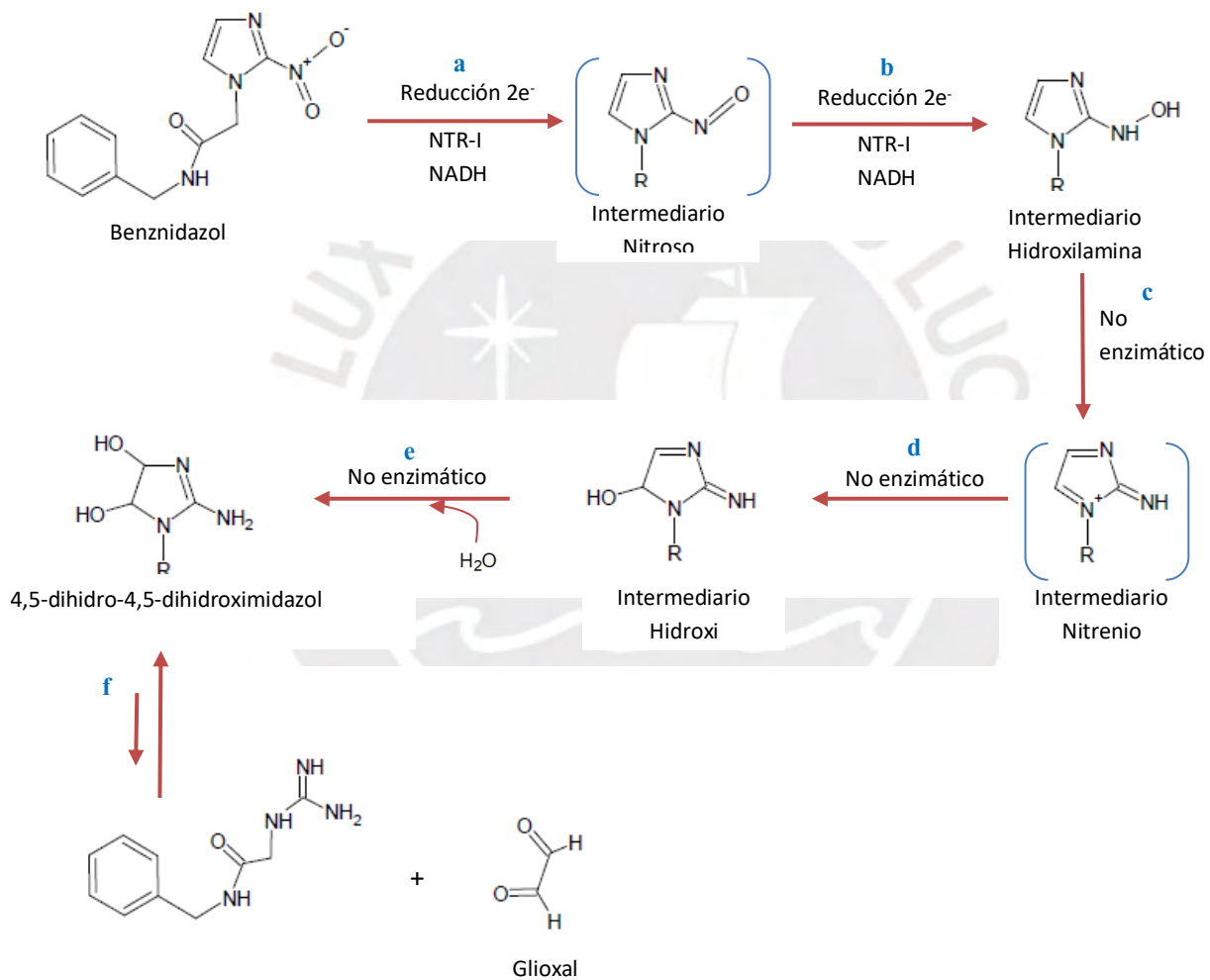


Imagen 11: Mecanismo de activación del BZN.⁴⁴

2.6. TcMIP como un nuevo blanco terapéutico

Tanto BZN como NFX son compuestos tóxicos al mismo tiempo para el tripanosoma y las células humanas, ya que, si bien adquieren su actividad biocida en un entorno próximo al parásito, también pueden dañar a las células del hospedador que se encuentren en un entorno próximo. Una estrategia terapéutica con menor rango de posibilidades de afectar al huésped radica en inhibir directamente los factores de virulencia del tripanosoma. Un factor de virulencia puede definirse como cualquier molécula producida por el patógeno cuya pérdida repercute solo en su actividad parasitaria. En este sentido, son indispensables para la transformación al estadio tripomastigote (infectivo), penetración celular, evasión de mecanismos de defensa y proliferación dentro del huésped.⁵⁰ De esta manera, al afectar compuestos exclusivos del tripanosoma, son en teoría inofensivos hacia las células humanas (al menos mediante interacciones directas).

Se han identificado diferentes factores de virulencia como potenciales blancos terapéuticos en el desarrollo de fármacos. En este trabajo, nos enfocaremos en TcMIP (Potenciador de Infectividad Macrófaga de *T. cruzi*) y se establecerán perspectivas de un posible mecanismo en conjunto de otros factores de virulencia. Factores adicionales que pueden ser de interés se muestran en la tabla 4, clasificados según su función.^{50,51}

Tabla 4: Algunos factores de virulencia identificados de *T. cruzi*^{50,51}

Resistencia y evasión del sistema inmune del huésped	<ul style="list-style-type: none"> • T-DAF 	<ul style="list-style-type: none"> • Tc52 	<ul style="list-style-type: none"> • Calreticulina (TcCRT)
Resistencia al daño oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> • Triparredoxina peroxidasa 	<ul style="list-style-type: none"> • TcMPX 	<ul style="list-style-type: none"> • TcCPX
Adhesión del tripomastigote a la célula e invasión de la misma	<ul style="list-style-type: none"> • gp82 • Oligopeptidasa B (OpB) • POP Tc80 	<ul style="list-style-type: none"> • Cruzipaina • TcTS • Calcineurina TcCaN 	<ul style="list-style-type: none"> • TcMIP
Escape fagolisosomal	<ul style="list-style-type: none"> • Tc-tox 		
Diferenciación celular (entre estadios)	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatidilinositol fosfolipasa C (TcPI-PLC) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>T. cruzi</i> 26S proteasoma 	

2.6.1. Estructura.

Las Peptidil Prolil *cis/trans* Isomerasas (PPIs) son una familia de proteínas que se caracteriza por catalizar la isomerización de enlaces peptídicos en el extremo N-terminal de las prolinas. Es decir, poseen una actividad de rotamasa, por lo que se desenvuelven como chaperonas en el plegado y desplegado de estructuras. Adicionalmente, además de su función catalítica, se ha demostrado que están implicadas en la respuesta inmune de los organismos, ya que pueden actuar como inmunosupresores.⁵² Las PPIs se

subdividen en tres tipos: ciclofilinas, PPIs del tipo parvulinas y FKBP, donde en esta última subfamilia existe un grupo de proteínas denominadas MIP (Potenciadores de Infectividad de Macrófagos). Las cuales simplemente son FKBP utilizadas como factores de virulencia y se encuentran ampliamente distribuidas en procariontas, eucariotas y algunos virus gigantes. TcMIP se encuentra en esta clasificación; sin embargo, la información que se tiene sobre ella -y en general sobre todas las MIPs- es limitada. Un último aspecto que será importante mencionar es que toda FKBP presenta como inhibidores naturales moléculas entre las cuales se encuentran rapamicina y FK506 (de ahí el nombre de esta familia de proteínas).

TcMIP consta de una masa de 18 kDa y una estructura de 167 aminoácidos monomérica que puede observarse en la imagen 12. Esta consiste en un núcleo responsable de la actividad de rotamasa compuesto de seis hojas- β antiparalelas (β 1-6) y una pequeña α -hélice (α 2). Cabe destacar que la hoja β 4 se encuentra dividida en β 4-a y β 4-b, las cuales están separadas por una cadena de 7 aminoácidos. Alrededor de la estructura central se encuentran dos α -hélices, una hacia el extremo N-terminal (α 1) y otra hacia el C-terminal (α 3), la cual posee una carga neta negativa en su superficie y es exclusiva de TcMIP, ya que no se ha encontrado en ninguna otra FKBP.⁵³

El sitio activo de esta proteína se encuentra entre las hojas- β y la hélice α 2 y constituye los residuos observados explícitamente en la imagen 12, los cuales son Asp103, Arg108, Phe102, Phe114, Phe163, Val119, Ile120, Ile155, Tyr146, Tyr92 y Trp123; quienes conforman un profundo bolsillo hidrofóbico. Adicionalmente, Tyr92, Asp103 y Arg108 se encuentran formando una especie de *cluster* mediante puentes de hidrógeno.⁵³

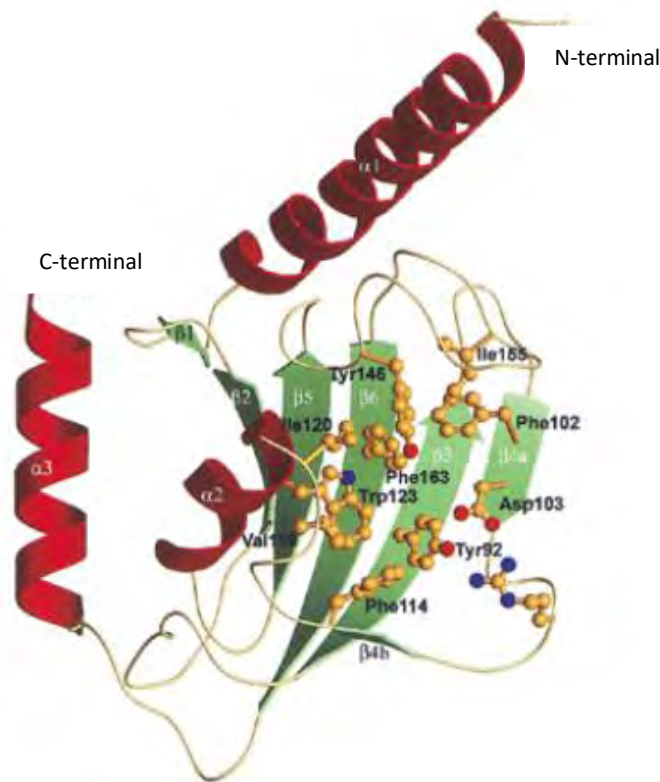


Imagen 12: Estructura de TcMIP (Modificado de Pereira).⁵³

Debido a comparaciones que se darán posteriormente, resulta útil establecer similitudes entre TcMIP y su análogo humano FKBP12, ya que ambas mantienen los mismos residuos en el bolsillo hidrofóbico. La única diferencia notable es un cambio de posición de Phe114 (quien viene a ser Phe46 en FKBP12), ya que en TcMIP Phe114 se encuentra contigua a Thr112, cuyo bajo volumen genera un pequeño vacío entre ellas, responsable de su posición diferente (imagen 13).^{53,54} Por otro lado, pese a su gran similitud en el sitio activo, ambas PPIs presentan marcadas diferencias estructurales. En primer lugar, la presencia de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 3$ es exclusiva del protozoo; en segundo lugar, TcMIP presenta una hoja β adicional ($\beta 1$). Además, la unión entre $\beta 4$ -b y $\alpha 2$ es de dos residuos más corta en el tripanosoma, lo cual genera una estructura más compacta, permitiendo un acercamiento del bucle $\beta 2$ - $\beta 3$, de esta manera el bucle se posiciona entre la cadena que une $\alpha 3$ con $\beta 6$ y el bucle entre $\beta 4$ -b y $\alpha 2$.⁵³

También se pueden establecer similitudes entre TcMIP y LpMIP (análogo proveniente de la bacteria *Legionella pneumophila*). Ambas proteínas poseen un núcleo con función rotamasa similar, salvo que la hoja $\beta 1$ se mantiene exclusiva en el protozoo. Adicionalmente, ambas poseen una hélice $\alpha 1$ en el extremo N terminal; sin embargo, ésta es más larga en LpMIP y se encuentra dispuesta sobre el núcleo de modo que se mantiene fija mediante tres puntos de contacto. Sumado a ello, esta hélice le permite a LpMIP dimerizar, mientras TcMIP se mantiene monomérica.⁵³ Respecto al sitio activo, difieren en el *cluster* formado entre Tyr92, Asp103 y Arg108, ya que este último residuo es reemplazado por una treonina, lo que impide la formación del puente de hidrógeno.⁵³ Por último, la diferencia más notoria radica en el extremo C-terminal, ya que TcMIP posee una α hélice suplementaria que no se encuentra en ninguna otra FKBP.⁵³

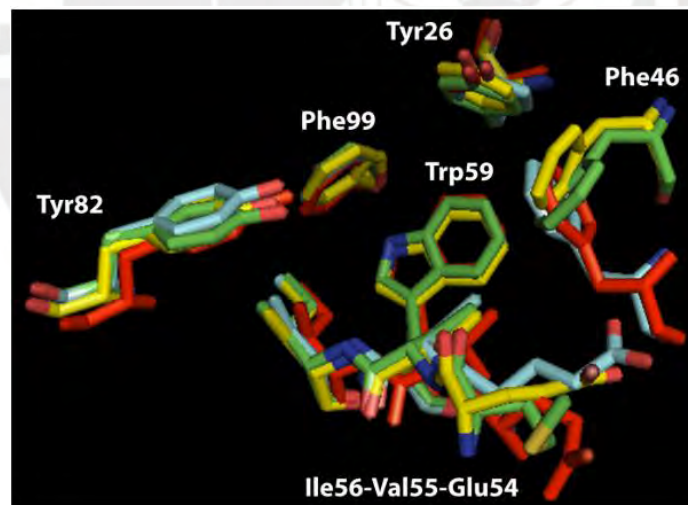


Imagen 13: Superposición de parte del bolsillo hidrofóbico en diferentes MIP's, de entre las cuales se observan: TcMIP (cian), FKBP12 (amarillo), LpMIP (rojo). Se aprecia también el cambio de posición en Phe46.⁵⁴

proteasa sobre el conformero *trans*. De esta manera, TcMIP acelera la interconversión *cis/trans* permitiendo la liberación de la nitroanilida con mayor velocidad.⁵⁶ Lamentablemente, el mecanismo catalítico de TcMIP no ha sido descubierto, y en términos generales, los mecanismos de las PPIs aún no están entendidos en su totalidad, menos aún los las FKBP de organismos protozoos.⁵⁴ Sin embargo, diferentes estudios permiten plantear mecanismos plausibles sobre la isomerización de enlaces *cis/trans* de esta familia de proteínas, por lo que en esta sección se hará una síntesis sobre todo lo relacionado a las FKBP en este aspecto.

En los enlaces peptídicos que involucren aminoácidos naturales se favorece la conformación *trans* debido a factores estéricos, donde la diferencia de la energía promedio entre los isómeros *cis/trans* es de 2,6 kcal/mol.⁵⁷ Sin embargo, en el caso particular de las prolinas, dado que su conformación genera una ciclación intrínseca de la cadena, la brecha energética favorece a la conformación *trans* en solo 0,5 kcal/mol.⁵⁷ Pese a esta pequeña diferencia, el porcentaje de enlaces *cis* encontrado experimentalmente en péptidos pequeños es de entre 5 y 20 %.⁵⁷ Por otro lado, la energía de activación necesaria para la isomerización es considerablemente mayor, alcanzando un valor aproximado de 19,2 kcal/mol, el cual es atribuido al efecto de resonancia entre el N y el C del carbonilo, que genera rigidez en el enlace.^{58,59} En este sentido, la función catalítica de las FKBP es reducir la energía de activación de la isomerización de los enlaces prolil (imagen 15) en 6.6 kcal/mol aproximadamente para acelerar la interconversión *cis/trans*.⁵⁹

Se sabe que la mayoría de las FKBP presentan una constante catalítica (K_{cat}/K_m) de segundo orden y que la energía de activación de la reacción catalizada presenta un gran componente entrópico, lo cual sugiere que la etapa determinante de la reacción se encuentra mediada por procesos físicos.⁵⁹ Adicionalmente, no se ha evidenciado efecto isotópico relevante al utilizar agua deuterada ($K_H/K_D = 1,1$) ni se ha encontrado dependencia del pH en un rango entre 5 y 9, lo cual descarta una catálisis general ácido-base.⁶⁰ Sin embargo, es importante destacar que a pH por debajo del rango establecido, la isomerización se ve catalizada, probablemente debido a la protonación del nitrógeno, lo que destruye la resonancia.⁶⁰

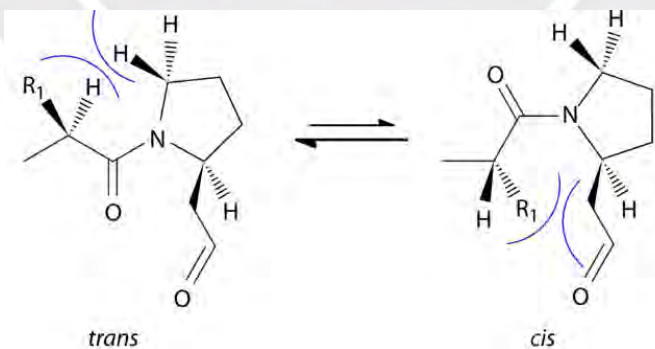


Imagen 15: Isomerización *cis/trans* de un enlace X-Pro. El equilibrio es favorecido naturalmente hacia el conformero *trans*.⁵⁴

Se pueden plantear analogías en base a la información disponible sobre otras FKBP de especies mejor estudiadas, particularmente de la proteína humana FKBP12. Esta información se podría tomar como referencia para entender el funcionamiento de TcMIP dada la similitud en la composición del bolsillo hidrofóbico de ambas proteínas. Hecho que se evidenció al estudiar la unión entre FKBP12 y FK506 (cuya estructura se muestra en la imagen 16) para encontrar residuos indispensables en la catálisis, donde se

descubrió que de los 13 residuos de la molécula humana que interactúan con el inhibidor, diez de ellos se encontraban conservados en TcMIP.^{53,59} En la tabla 5 se establecen homólogos estructurales (equivalentes) en TcMIP, donde los guiones representan aminoácidos no conservados y los remarcados son quienes forman parte del bolsillo hidrofóbico.⁵³ Estas similitudes podrían indicar que TcMIP sigue un mecanismo muy parecido a su equivalente humano.

Algunos estudios adicionales con FKBP12 han podido determinar una ligera dependencia del pH entre valores de 8 y 10,5. Esto se debería a que la tirosina 82, quien viene a ser Y146 en TcMIP y pertenece al bolsillo hidrofóbico de ambas, podría establecer un puente de hidrógeno con el nitrógeno de la amida, incluso podría asistir la catálisis.⁵⁹ Adicionalmente, el segundo efecto isotópico fue medido para la isomerización del péptido Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-p-nitroanilida, donde se analizaron los hidrógenos del carbono α del grupo carbonil de la glicina unido al nitrógeno de la prolina, obteniendo un valor de K_H/K_D igual a 1,05 para ambos hidrógenos.⁶⁰ Este resultado indica una mayor labilidad para los hidrógenos en el estado de transición respecto al inicial, lo cual solo puede lograrse si el intermediario consistiera en una rotación parcial del enlace C-N (imagen 17). En este estado de transición se rompería la resonancia C-N y se reforzaría el carácter de cetona entre el carbono y oxígeno, lo cual permitiría una hiperconjugación de los hidrógenos- α .⁶⁰

Tabla 5: Residuos de FKBP12 que interactúan con FK506 y equivalentes en TcMIP.⁵⁹

Interacción con FK506					
Mediante puente de hidrógeno		Hidrofóbicas			
FKBP12	Equivalente en TcMIP	FKBP12	Equivalente en TcMIP	FKBP12	Equivalente en TcMIP
D37	D103	Y26	Y92	F36	F102
E54	E118	F46	-	R42	R108
I56	I120	W59	W123	F48	F114
Y82	Y146	F99	F163	Q53	-
				H87	-

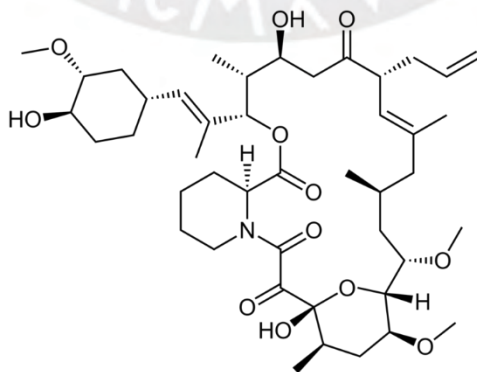


Imagen 16: Estructura de FK506

Todas estas evidencias apuntan a un mecanismo del tipo “catálisis por distorsión”, particularmente una catálisis por distorsión inasistida. Según la cual, el coste energético está fuertemente influenciado por la dificultad de romper la resonancia del enlace amida, luego de lo cual ocurrirá la torsión. En este sentido, la pérdida de resonancia estaría compensada por la energía ganada gracias a la unión proteína-sustrato.^{59,60}

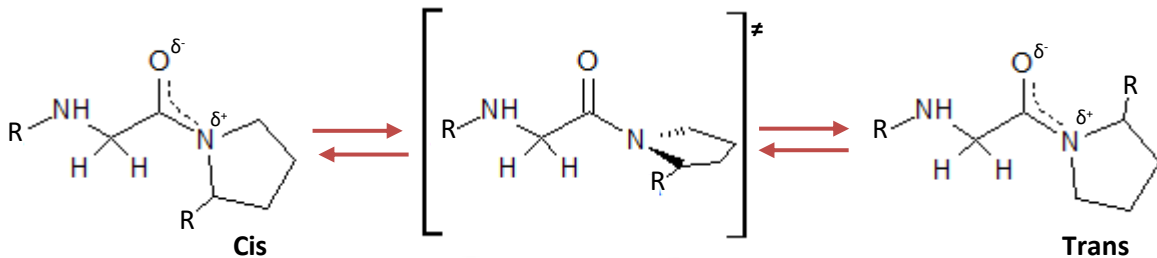


Imagen 17: Posible estructura del estado de transición en la isomerización de enlaces proliil. (Modificado de Stein *et al.*).⁶⁰

La función de isomerasa de las FKBP les confiere roles biológicos importantes en los organismos, ya que actúan como chaperonas en el plegado de proteínas como, por ejemplo, el colágeno. El colágeno es la proteína más abundante en mamíferos y particularmente en humanos compone un tercio en peso del total de proteínas.⁶¹ Cumple funciones estructurales, donde destaca por ser el mayor componente de la matriz extracelular (MEC), el cual es el medio estructural sobre el cual se encuentran todas las células del organismo. Además, les brinda soporte y se encuentra involucrada en procesos de comunicación, respuesta inmune, nutrición, y regeneración tisular, entre otras.^{61,62} La estructura del colágeno consiste en tres cadenas polipeptídicas que se entrelazan formando una triple hélice con orientación de mano derecha. Estas cadenas se encuentran constituidas en un 25% por enlaces proliil o hidroxiprolil, de los cuales el 100% se encuentra en conformación *trans*.⁶³ De esta manera, el paso determinante en la formación de la triple hélice es la isomerización de los enlaces proliil (o hidroxiprolil) que naturalmente se encontraban en conformación *cis* a *trans*, para posteriormente formar la debida estructura terciaria.⁶³ De esta forma diferentes FKBP contribuyen al plegado del colágeno en el cuerpo humano, como por ejemplo FKBP10, FKBP19, FKBP22, FKBP65, etc. (donde las tres últimas proteínas han demostrado tener un poco más de selectividad sobre las hidroxiprolinas).⁶⁴

Queda claro el rol biológico catalítico de las FKBP, pero ¿cómo se relaciona con la actividad virulenta de las MIPs? Resulta que, así como algunas de estas proteínas isomerizan enlaces para favorecer el correcto plegado de la estructura, también podría ser posible que otras proteínas tengan un efecto contrario; es decir, que desestabilicen estructuras. Por ejemplo, la interacción entre LpMIP y colágeno humano, particularmente colágeno IV (ya que es sobre el cual esta proteína presenta mayor actividad) ha sido estudiada.⁶⁶ Este tipo de colágeno resulta el mayor constituyente de la lámina basal en la MEC y tiene la característica de presentar interrupciones en la típica estructura Gly-X-Y (donde X e Y suelen ser prolinas o hidroxiprolinas).⁵⁴ Para determinar el efecto de LpMIP, Wagner y colaboradores evaluaron mediante fluorescencia la cantidad de bacterias *Legionella pneumophila* (Lp) que fueron capaces de infectar células epiteliales pulmonares NCI-H292, para ello trabajaron con dos especímenes: JR32 (Lp con actividad MIP) y JR32-2 (mutante de Lp sin actividad MIP).⁶⁵ El experimento se realizó sobre células NCI-H292 (carentes de MEC) y NCI-H292/ECM (las cuales conservaban la MEC), como se aprecia en las imágenes 18a y 18b

respectivamente. Mediante el primer gráfico se puede comprobar que en ausencia de MEC, Lp es capaz de infectar a la célula independientemente de si posee actividad LpMIP (caso que no ocurre con *E. coli*, quien no puede atravesar las membranas celulares). Sin embargo, en el experimento realizado con células NCI-H292/MEC (18b) se aprecia como solo la bacteria con actividad MIP es capaz de infectar las células pulmonares. Se puede concluir que, en este caso, la proteína MIP posee alguna función que le permite a la bacteria hacerse paso a través del colágeno. Un último aspecto a destacar es que el uso de Pefabloc Sc y rapamicina de alguna manera logró disminuir la capacidad infectiva de Lp. Rapamicina, a pesar de ser un conocido inhibidor de las FKBP's también presenta una interacción particular en procesos biológicos (como se describirá en el siguiente subtema), por lo que no queda claro si la disminución de la infectividad está relacionada con la inhibición de la actividad de isomerasa de LpMIP o con alguna otra función no catalítica. Por otro lado, Pefabloc Sc es un inhibidor de la familia de proteasas de serina, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar al colágeno. De esta manera, resulta coherente que al utilizar Pefabloc los niveles de células infectadas disminuyan notablemente. Lo curioso es que este indicador disminuyó a pesar de la presencia activa de LpMIP, por lo que esta información sugiere la existencia de un mecanismo conjunto entre LpMIP y otros factores de virulencia, específicamente proteasas de serina.⁶⁵

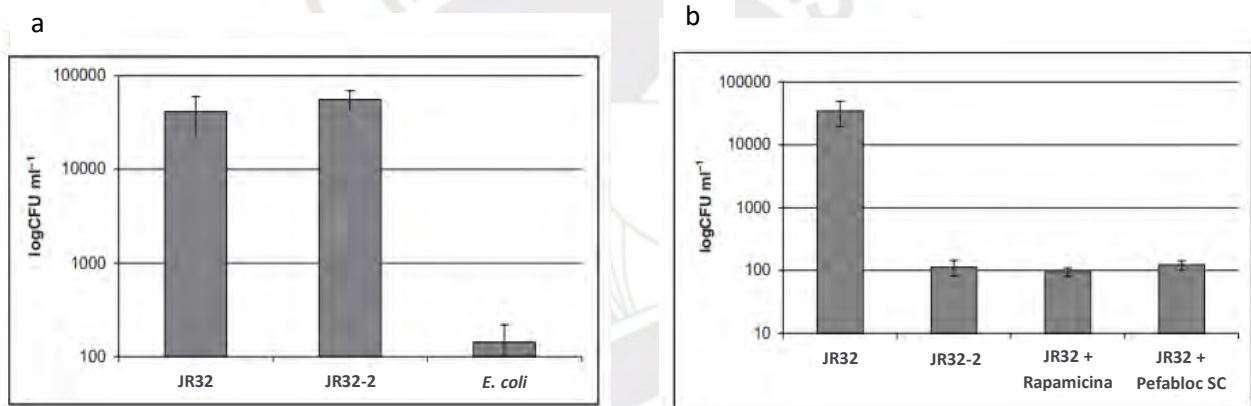


Imagen 18: Medición de la infección de bacterias Lp en células NCI-H292 (izquierda, 18a) y NCI-H292/MEC (derecha, 18b). (Modificado de Wagner *et al.*).⁶⁵

Como ya se ha mencionado, el plegado del colágeno requiere que todos los enlaces prolil se encuentren en conformación *trans*, para lo cual requieren la acción de las PPIs. Asimismo, se ha puesto en evidencia la posibilidad de las MIPs de afectar de alguna manera a estas estructuras. De esta manera, la información expuesta hasta ahora sugiere que la acción infectiva de TcMIP podría ser la de desestabilizar la estructura del colágeno isomerizando los enlaces *trans* y volviéndolos susceptibles a la acción de proteasas. Traduciendo los resultados de LpMIP a TcMIP, se podría plantear un efecto en conjunto con Tc80, una proteasa serina que actúa como una prolil oligo peptidasa y que ha sido identificada como factor de virulencia (tabla 4). Sin embargo, no existe literatura al respecto y se requiere mayor investigación. Adicionalmente, tampoco se puede asegurar que el mecanismo infectivo de TcMIP se deba a su actividad de rotamasa, por lo que en la siguiente sección se evaluarán algunos mecanismos no catalíticos.

2.6.2.2. Mecanismo no catalítico.

Las FKBP5 también poseen interacciones en el organismo que no están relacionadas con su actividad de isomerasa, ya que pueden actuar como reguladores en determinados procesos biológicos. Los más resaltantes son de las rutas de señalización de mTOR y TGFβ.

Inhibición de mTOR:

mTOR (por las siglas en inglés de “Objetivo de Rapamicina en Mamíferos”) es una quinasa involucrada en una vasta red de procesos biológicos entre los que se encuentran la expresión de ciertos factores de crecimiento y regulación celular, proliferación de glóbulos blancos, detección de disponibilidad de nutrientes, energía y O₂, entre otros y puede conformar dos complejos de señalización, mTORC1 y mTORC2.⁶⁶ A pesar del nombre de esta quinasa, la rapamicina por sí sola no es capaz de inhibirla, sino que necesita formar un complejo con FKBP12, de modo que solo cuando se tenga el complejo FKBP12-rapamicina podrá interactuar de manera alostérica con uno de los dominios de mTORC1, específicamente el dominio FRB (imagen 19), mientras que el complejo mTORC2 no se verá afectado.⁶⁶ Si bien existen 14 FKBP5 humanas que pueden cumplir la misma función, FKBP12 es la que se encuentra en mayor concentración. Sin embargo, algunas FKBP5 como FKBP38 pueden inhibir directamente a mTORC1, y se especula que serían el regulador natural en la célula.⁶⁶

La inhibición de mTOR genera efectos inmunosupresores en el organismo, por lo que es utilizado en intervenciones quirúrgicas donde se esté realizando algún trasplante de órganos para evitar una posible reacción adversa del paciente. Además, se ha comprobado que la rapamicina posee ciertas propiedades anticancerígenas; sin embargo, su uso prolongado genera efectos secundarios y parece que termina comprometiendo las funciones de mTORC2. Finalmente, es importante destacar que FK506 también presenta un efecto inmunosupresor debido a la formación de complejos con FKBP12; no obstante, la ruta metabólica es diferente, ya que interrumpe las señales de los receptores de células T.⁶⁷

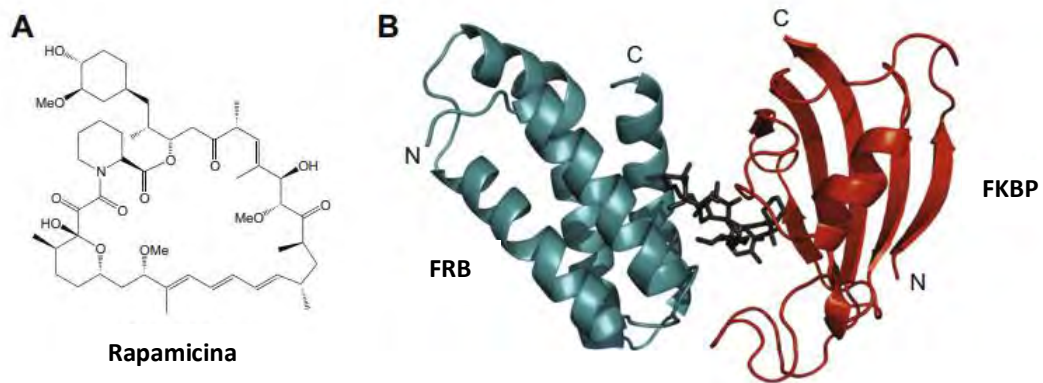
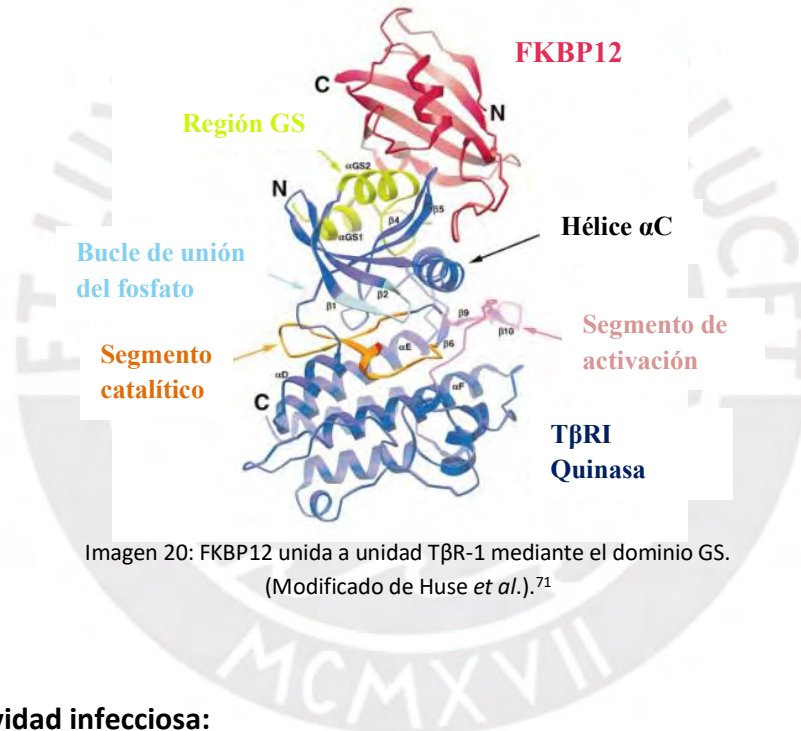


Imagen 19: A: Estructura de la rapamicina (izquierda) y B: interacción entre FKBP12, rapamicina y mTOR mediante su dominio FRB. (Modificado de Putyrski *et al.*).⁶⁸

Inhibición de TGFβ:

Los factores de transformación de crecimiento β (TGF β) pertenecen a una superfamilia que incluye una gran cantidad de proteínas relacionadas con el desarrollo celular y de tejidos, incluyendo la diferenciación y proliferación celular, la apoptosis y el mantenimiento de la homeostasis, entre otras.⁶⁹ Particularmente TGF β es una proteína de membrana perteneciente a la familiar de serinas-treoninas quinasas y está conformada por dos subunidades denominadas T β R-1 y T β R-2. El funcionamiento natural de señalización de esta proteína comienza con la unión de los sustratos específicos, los cuales generan un cambio de conformación que le permite a T β R-2 fosforilar T β R-1, proceso que se lleva a cabo en el dominio GS del complejo 1, activándolo.⁷⁰ Sin embargo, FKBP12 es capaz de inhibir esta función, esta vez sin la necesidad de unirse a otra molécula, ya que se enlaza al mismo dominio GS (imagen 20). De modo que impide la fosforilación e inhibe el mecanismo, por lo que, según Chen *et al.*, su función sería la de impedir fosforilaciones espontáneas que no hayan sido activadas por los sustratos respectivos.⁷⁰



2.6.3. Actividad infecciosa:

Una vez que ya se ha explicado todo lo relacionado a las FKBP, resultará mucho más sencillo para el lector comprender las evidencias que señalan a TcMIP como un factor de virulencia, con lo cual se concluirá esta sección.

Moro *et al.* demostraron que TcMIP juega un rol importante en la capacidad infectiva del tripanosoma, ya que, en primer lugar, es secretada exclusivamente por tripanosomas metabólicamente activos en el estadio tripomastigote (estadio infeccioso).⁵⁶ En segundo lugar, se determinó que la inhibición de TcMIP mediante 2 nM de FK506 y 2 nM de L-685,818, disminuyó la cantidad de tripanosomas que lograron infectar células HeLa en 57% y 24% respectivamente.⁵⁶ Si bien FK506 mostró mejores resultados, el hecho que se encuentre involucrado en otros procesos de regulación y señalización no permite determinar si la

disminución observada se deba a la actividad catalítica o por haber afectado otros procesos celulares. Es por ello, que la disminución de 24% obtenida con L-685,818 (ligando que no ha demostrado que confiera de capacidad inmunosupresora a los complejos con FKBP) aumenta las posibilidades de que la reducción en la infectividad esté relacionada con la actividad de isomerasa, o en su defecto, elimina mecanismos involucrados con rutas de inhibición de receptores de células T.⁵⁶ En tercer lugar, la función que realiza esta proteína tiene un efecto directo sobre la célula huésped y no sobre el mismo parásito. Esto pudo demostrarse gracias a que se pretrataron células LLC-MK2 con TcMIP 150 nM y posteriormente se incubaron junto con tripanosomas. Los resultados indicaron que las células que ya habían sido expuestas a TcMIP presentaron un incremento de 72% -respecto a células no tratadas- en la cantidad de parásitos que lograron infectarlas.⁵⁶

Adicionalmente, Pereira y colaboradores compararon la efectividad de la capacidad infectiva de TcMIP y LpMIP. Los resultados que obtuvieron evidencian que células tratadas con ambas proteínas indistintamente permiten la infección de tripanosomas. Inclusive TcMIP podría ser intercambiada por LpMIP, lo cual da la posibilidad que actúen bajo el mismo mecanismo, aunque el primero permite un mayor ingreso de tripanosomas a la célula huésped en un factor de más del doble. Los autores mencionan que la intercambiabilidad entre ambas proteínas podría ser un indicio de la participación de la hélice $\alpha 1$ (la cual es común en ambas) como factor de reconocimiento.⁵³

Todos estos resultados pueden dar un indicio de la función que cumpliría TcMIP en la invasión parasitaria, la cual podría ser la isomerización de enlaces prolil de alguna proteína estructural -como el colágeno- del huésped, lo cual desestabilizaría su estructura y permitiría su ruptura mediante la acción de otros factores de virulencia.

3. Cribado molecular mediante RMN para el desarrollo de fármacos

En el capítulo anterior se ha puesto en evidencia que la enfermedad de Chagas es una problemática seria en la región de América Latina, la cual afecta gravemente a las poblaciones más vulnerables. Por si fuera poco, los tratamientos disponibles presentan una eficacia cuestionable en la etapa crónica y un altísimo porcentaje de reacciones adversas (ADRs). Por este motivo, la necesidad de desarrollar fármacos más selectivos, eficientes y que garanticen la recuperación del paciente sin exponerlo a mayor riesgo debería tener un carácter prioritario en la comunidad científica. Es por ello que se ha identificado al factor de virulencia TcMIP como un candidato interesante para el desarrollo de fármacos, ya que, al inhibir su actividad, la capacidad infectiva de *T. cruzi* disminuye.

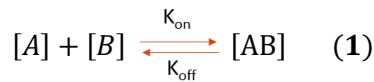
El desarrollo de fármacos es un proceso que conlleva tiempo e involucra diversas etapas, donde la primera consiste en la identificación y validación de compuestos que se unan y modulen la actividad de una molécula determinada, en este caso, se busca la inhibición de TcMIP.¹² Existen diferentes métodos capaces de detectar las interacciones proteína-ligando con buena sensibilidad que son usados en el desarrollo de fármacos, como por ejemplo: ELISA, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Calorimetría Isotérmica de Titulación (ITC), Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR), Termoforesis a Microescala (MST), y cristalografía de rayos X, entre otras.^{12,72}

De todas las técnicas mencionadas anteriormente, la resonancia magnética destaca por presentar notables ventajas. (i) Las condiciones a las que se realiza la detección no requieren una preparación previa de la muestra, ya que solo es necesario tener a la proteína y al ligando en solución. De esta manera, no se necesita fijar ni la proteína ni el ligando a una superficie sólida (como el caso de SPR). Adicionalmente, la proteína se encontrará en total libertad de movimiento y conservará su conformación y flexibilidad. (ii) No se necesita marcar la proteína con algún anticuerpo, fluoróforo o molécula particular (como sí ocurre en ELISA y MST). (iii) Presenta una gran versatilidad, ya que se pueden realizar una gran cantidad de experimentos que permitan confirmar la interacción, muchos de los cuales son sumamente rápidos y permiten realizar cribados de una gran cantidad de compuestos. (iv) Finalmente, el mayor atractivo de esta técnica es su altísima sensibilidad y el hecho que permita no solo identificar interacciones, sino también cuantificarlas y obtener información estructural sobre qué residuos específicos participaron en la interacción. En este sentido, tener asignado previamente el espectro ^1H - ^{15}N HSQC será indispensable. Por otro lado, si bien la cristalografía de rayos X también otorga información estructural contundente, muchas proteínas son muy difíciles o imposibles de cristalizar.¹²

Las técnicas de RMN utilizadas para evaluar la interacción proteína-ligando aplicadas al desarrollo de fármacos se dividen según el componente que se esté monitoreando por RMN: el ligando o la proteína.⁷³ En este capítulo se explicarán diferentes técnicas de RMN útiles en el desarrollo de fármacos y que podrían ser de utilidad en estudios posteriores de inhibición de TcMIP u otros factores de virulencia. Sin embargo, antes de explicar los métodos propuestos, será necesario establecer algunos conceptos que son fundamentales para el entendimiento de los mismos, como es el caso del K_{ex} (constante de intercambio, por sus siglas en inglés) y los rangos de velocidad de intercambio con los que se puede trabajar.

3.1. Constante de intercambio K_{ex} y velocidades de intercambio

El intercambio químico es un proceso dinámico dependiente del tiempo que involucra la interconversión a dos o más estados diferentes.⁷³ En este sentido, podemos definir un sistema proteína-ligando donde [A] representa al ligando, [B] a la proteína y [AB] al complejo proteína-ligando, obteniendo las relaciones (1) y (2) en el equilibrio, donde esta última representa el K_D (constante de disociación). Es importante destacar que K_{on} (constante cinética de asociación) se encuentra limitada por procesos de difusión, y en el caso de una interacción proteína-ligando es del orden de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.



$$K_D = \frac{K_{off}}{K_{on}} = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad (2)$$

Asimismo, podemos definir la constante cinética de intercambio entre el estado libre del ligando (A) y el complejo (K_{ex}).

$$K_{ex} = K_{on} [B] + K_{off} \quad (3)$$

Aplicando esto a un espectro RMN obtenemos la imagen 21, donde se observan dos señales ubicadas a frecuencias V_A y V_{AB} , las cuales se pueden interpretar como estado libre y enlazado del ligando, donde la intensidad es proporcional a la concentración del ligando y del complejo proteína-ligando. Si se compara K_{ex} con la diferencia de frecuencia (ΔV) entre ambas señales se pueden deducir tres casos. En el primer caso, donde K_{ex} resulta mucho mayor a ΔV , el intercambio es tan rápido que solo se observa el promedio ponderado por la concentración de ambas señales. El segundo caso sería cuando el intercambio es muy lento y K_{ex} es menor que ΔV , lo que significa que se pueden observar ambas señales de forma independiente; y finalmente se tienen los casos intermedios, donde las bandas se ensanchan y se desplazan.

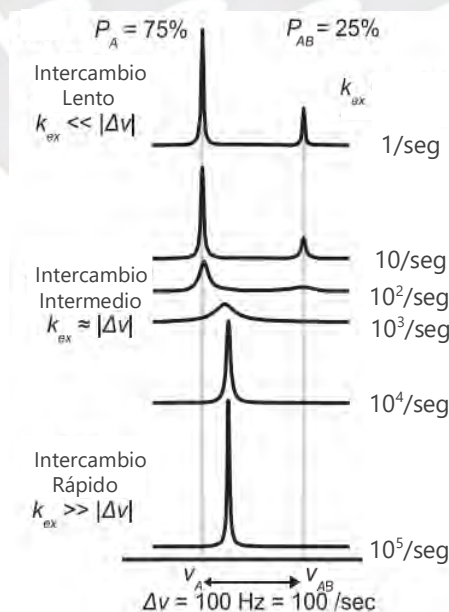


Imagen 21: Diferentes casos de comparación entre K_{ex} y ΔV . (Modificado de Kleckner *et al.*).⁷³

De esta manera, los métodos basados en el ligando, nos permiten estudiar interacciones en intercambio rápido que equivalen a constantes de disociación mayores a $10 \mu\text{M}$. Por otro lado, los métodos basados en la proteína nos permitirán trabajar en todo el rango de intercambios, ya sean lentos o rápidos.

3.2. Métodos basados en el ligando

Los métodos basados en el ligando se basan en las sustanciales diferencias fisicoquímicas entre la proteína y el ligando, principalmente de tamaño, difusión traslacional, tiempo de relajamiento y tiempo de correlación rotacional (τ_c), el cual representa el tiempo promedio en el que una molécula mantiene una determinada orientación espacial.⁷⁴ Se caracterizan por requerir bajas concentraciones de las proteínas (aproximadamente entre 5 y $50 \mu\text{M}$), por utilizar experimentos generalmente unidimensionales con buena sensibilidad y rapidez y por no requerir de marcaje isotópico.⁷² Los métodos que serán descritos están basados en el efecto nuclear Overhauser (efecto NOE), por lo que será necesario explicarlo de manera breve; así mismo, se expondrán algunas técnicas complementarias basadas en este efecto que serán de ayuda a lo largo del capítulo.

3.2.1. Efecto Nuclear Overhauser (NOE).

A diferencia de técnicas espectroscópicas convencionales, que detectan la absorción o emisión de fotones, en RMN se mide la corriente inducida por la precesión de la magnetización (en el plano ortogonal al campo magnético del imán), luego de haber sido excitada por un pulso de radiofrecuencia. Este vector de magnetización macroscópico resulta del momento magnético de los espines. Si bien la precesión conserva la energía, el relajamiento del vector de magnetización resulta de transiciones energéticas estocásticas entre los diferentes niveles de energía del espín que poco a poco devuelven la magnetización a su estado de equilibrio. Para átomos con un valor de espín de $\frac{1}{2}$ (como ^1H , ^{13}C y ^{15}N) existen dos niveles energéticos: α ($+\frac{1}{2}$) y β ($-\frac{1}{2}$), donde el primer estado es el de menor energía y el más poblado según la distribución de Boltzman.⁷⁵

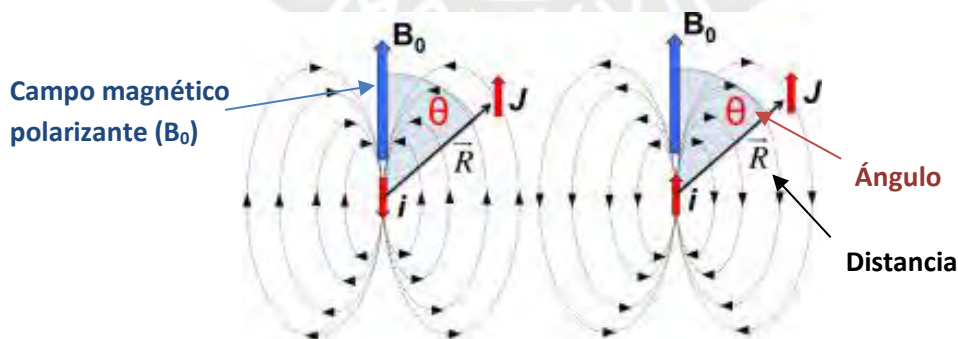


Imagen 22: Representación esquemática de los parámetros de distancia y orientación, los cuales influyen en el acoplamiento dipolar. A la derecha observamos la interacción dipolar de dos espines paralelos y a la izquierda de dos espines antiparalelos (Modificado de Gil I.).⁷⁶

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales el sistema regresa al equilibrio, pero sin duda, la fluctuación de la interacción dipolar es el principal mecanismo de relajamiento en RMN. Esta interacción dependerá de la orientación de los espines respecto al campo magnético y de la distancia entre ellos (menor a 5 Å para interacciones dipolares $^1\text{H}-^1\text{H}$).⁷⁷ Esto se debe a que, como se muestra en la imagen 22, cada espín (en este caso i) genera un pequeño campo magnético alrededor suyo que influirá sobre otros núcleos (como por ejemplo j) si es que se encuentran lo suficientemente cercanos espacialmente.

La imagen 23 muestra de manera simplificada un sistema de dos espines AX acoplados dipolarmente en el cual existen cuatro niveles energéticos ($\alpha_A\alpha_X$, $\alpha_A\beta_X$, $\beta_A\alpha_X$ y $\beta_A\beta_X$). Si el sistema se encuentra en solución, las interacciones estarán moduladas por el movimiento de las moléculas, donde un parámetro útil para medir este factor es el tiempo de correlación rotacional (τ_c), el cual representa el tiempo promedio que le toma a la molécula girar un radián.⁷⁸ Por ende, dicha imagen representa la interacción dipolar en un momento determinado, ya que en realidad fluctúa con el movimiento molecular.⁷⁹ Podemos observar 3 tipos de transiciones energéticas: las transiciones cuánticas únicas (W_A y W_X), donde las transiciones de ambos espines son independientes y las transiciones cuánticas dobles (W_2) y cuánticas cero (W_0), en las cuales la transición de un espín sí afecta al estado del otro.⁸⁰ Si escribimos las ecuaciones de evolución de la población de cada uno de los cuatro niveles, donde W hace referencia a la probabilidad de la transición y N a la población del estado, tendremos:⁸⁰

$$\frac{dN_{\alpha_A\alpha_X}}{dt} = -(W_2 + W_X + W_A)N_{\alpha_A\alpha_X} + (W_2)N_{\beta_A\beta_X} + (W_X)N_{\alpha_A\beta_X} + (W_A)N_{\beta_A\alpha_X} \quad (4a)$$

$$\frac{dN_{\alpha_A\beta_X}}{dt} = -(W_0 + W_A + W_X)N_{\alpha_A\beta_X} + (W_0)N_{\beta_A\alpha_X} + (W_A)N_{\beta_A\beta_X} + (W_X)N_{\alpha_A\alpha_X} \quad (4b)$$

$$\frac{dN_{\beta_A\alpha_X}}{dt} = -(W_0 + W_X + W_A)N_{\beta_A\alpha_X} + (W_0)N_{\alpha_A\beta_X} + (W_X)N_{\beta_A\beta_X} + (W_A)N_{\alpha_A\alpha_X} \quad (4c)$$

$$\frac{dN_{\beta_A\beta_X}}{dt} = -(W_2 + W_A + W_X)N_{\beta_A\beta_X} + (W_2)N_{\alpha_A\alpha_X} + (W_A)N_{\alpha_A\beta_X} + (W_X)N_{\beta_A\alpha_X} \quad (4d)$$

Estas ecuaciones pueden ser agrupadas y reescritas en términos de la diferencia de magnetización, obteniendo la ecuaciones (5a y 5b), las cuales se simplifican en 6a y 6b (ecuaciones de Solomon).⁸⁰

$$\frac{d\Delta A_z(t)}{dt} = -(W_0 + 2W_A + W_2) \Delta A_z(t) - (W_2 - W_0) \Delta X_z(t) \quad (5a)$$

$$\frac{d\Delta X_z(t)}{dt} = -(W_0 + 2W_X + W_2) \Delta X_z(t) - (W_2 - W_0) \Delta A_z(t) \quad (5b)$$

$$\frac{d\Delta A_z(t)}{dt} = -(\rho_A) \Delta A_z(t) - (\sigma_{AX}) \Delta X_z(t) \quad (6a)$$

$$\frac{d\Delta X_z(t)}{dt} = -(\rho_X) \Delta X_z(t) - (\sigma_{AX}) \Delta A_z(t) \quad (6b)$$

Si analizamos las ecuaciones de Solomon observaremos que el relajamiento depende de dos factores: ρ y σ , donde el primero es una constante de autorelajamiento independiente del acoplamiento y el segundo es la constante de relajamiento cruzado, a la cual se le denomina efecto NOE. El relajamiento cruzado está compuesto por dos transiciones: W_2 y W_0 , cuyas probabilidades determinan el signo de σ .⁸⁰ Las transiciones W_0 se ven favorecidas por campos de dipolo fijos, los cuales incrementan a medida que el ligando aumenta de tamaño, ya que su tiempo de correlación rotacional (τ_c) se vuelve mayor.^{12,75} Por ejemplo, para ligandos típicos de 300 Da, el valor de τ_c será 0,2 ns, lo que conlleva un alto valor de W_2 y un efecto NOE positivo, mientras que proteínas de 30 kDa tendrán un τ_c de 20 ns, derivando en un alto valor de W_0 y por lo tanto un efecto NOE negativo.^{12,75} Adicionalmente, si un ligando se une a una proteína, adquirirá su valor de τ_c y por ende, sus propiedades de relajamiento, por lo que evidenciará un efecto NOE negativo. Un resumen con las propiedades de los ligandos en estado libre y enlazado se muestra en la tabla 6.

Para realizar un experimento de tipo NOE solo es necesario perturbar la población de alguno de los niveles de energía. Por ejemplo, si se satura a un protón (entiéndase por esto igualar las poblaciones α y β mediante un pulso de radiofrecuencia), es de esperarse una respuesta del otro núcleo con el que se encuentra acoplado, ya sea un incremento o decremento de su señal dependiendo si el efecto NOE es positivo o negativo. En consecuencia, existen dos principales experimentos que utilizan el efecto NOE: el experimento de transferencia de saturación (STD), donde se irradia de manera continua y selectiva una de las señales hasta igualar las poblaciones de los dos estados de energía, y experimentos de transferencia NOE (como waterLOGSY) donde a través de un pulso de 180° se invierte la población de uno de los espines. En ambos casos una parte de la magnetización será transferida de un núcleo a otro por el efecto NOE.¹²

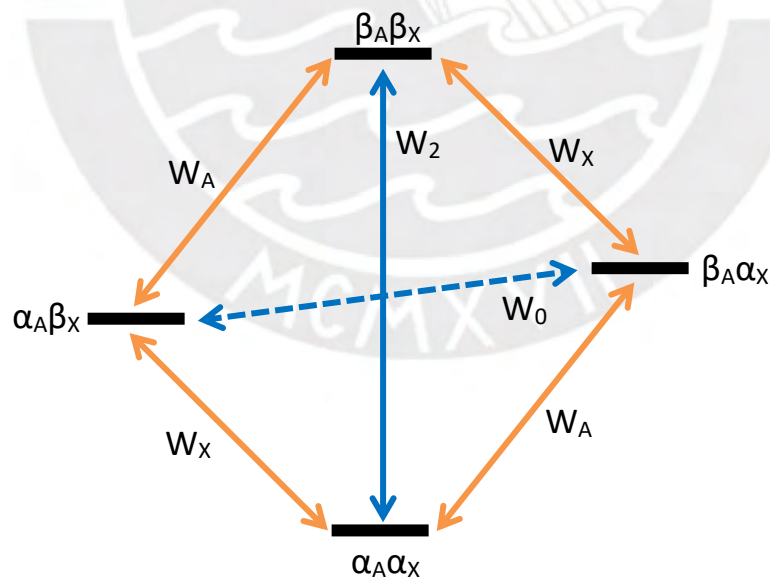


Imagen 23: Diagrama de energía de un sistema de dos espines acoplado dipolarmente.

Experimentos NOESY y tr-NOESY.

Antes de explicar a detalle los dos métodos anteriormente mencionados, resulta útil analizar una de las técnicas más sencillas que hacen uso del efecto NOE, denominada NOESY (Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser). En este método se obtiene un espectro 2D ^1H - ^1H que presenta información del acoplamiento dipolar entre los hidrógenos (imagen 24). En este tipo de espectros se obtienen dos tipos de señales, una señal diagonal que representa a los hidrógenos de la molécula y señales fuera de la diagonal (señales cruzadas) que nos indican si efectivamente existe acoplamiento dipolar entre dos hidrógenos. De esta manera, el experimento NOESY resulta útil, por ejemplo, para poder diferenciar isómeros, debido a que la distancia entre ciertos hidrógenos será diferente en cada conformero.

Esta técnica también nos sirve para evaluar interacciones proteína-ligando. Hemos visto que el valor de τ_c es diferente si el ligando se encuentra libre o enlazado (ya que al estar enlazado adquiere el inmenso valor del τ_c de la proteína). Entonces, si se realiza un experimento NOESY en presencia de una proteína (el cual pasará a llamarse tr-NOESY), el signo (fase) de los picos que se encuentran fuera de la diagonal indicarán si es que hubo interacción. En resumen, si se considera la señal diagonal con una fase negativa, la señal correlacional de una molécula pequeña presentará un signo opuesto, es decir positivo (representado de color rojo en la imagen 24a).^{12,74} Si el experimento se realiza en presencia de una proteína, en caso de ocurrir una unión con el ligando, el parámetro τ_c incrementará notablemente (afectando a todos los hidrógenos, en este caso H_1 , H_2 , H_3 y H_4) y se generará un efecto NOE negativo. Como nos encontramos en intercambio rápido ($K_{\text{ex}} \gg \Delta V$) el efecto NOE se promediará entre la forma libre y enlazada resultando en un cambio de fase de las señales cruzadas; es decir, ahora presentarán fase negativa, igual que las señales de la diagonal (representado por puntos celestes en la imagen 24b). Cabe destacar que se puede deducir cierta información estructural en el ejemplo mostrado, ya que si hay un cambio de conformación del ligando entre sus estados libre y enlazado, se verá reflejado en las señales correlacionales de los hidrógenos, en este caso entre los protones 2 y 3.^{12,81}

En síntesis, al observar las fases de las señales que no se encuentren en la diagonal, se podrá determinar si existió una interacción proteína ligando.^{12,81} Cabe destacar que la sensibilidad de este método se encuentra entre el rango 1 mM - 10 μM , ya que si el intercambio es muy lento no todas las moléculas se verán afectadas por la interacción y es muy probable que el proceso de relajación ocurra antes que la molécula se disocie, por lo que no podrá detectarse el cambio.⁸¹

Tabla 6: Resumen de las propiedades del ligando en función de su estado libre o enlazado

Propiedades del ligando		
	Libre	Enlazado
Entorno químico	Solvente	Proteína
τ_c	Rápido	Lento
Efecto NOE	Positivo	Negativo
Señales cruzadas en NOESY*	Débil positivo	Fuerte negativo
Difusión traslacional	Rápida	Lenta

*Respecto a una señal diagonal con fase negativa

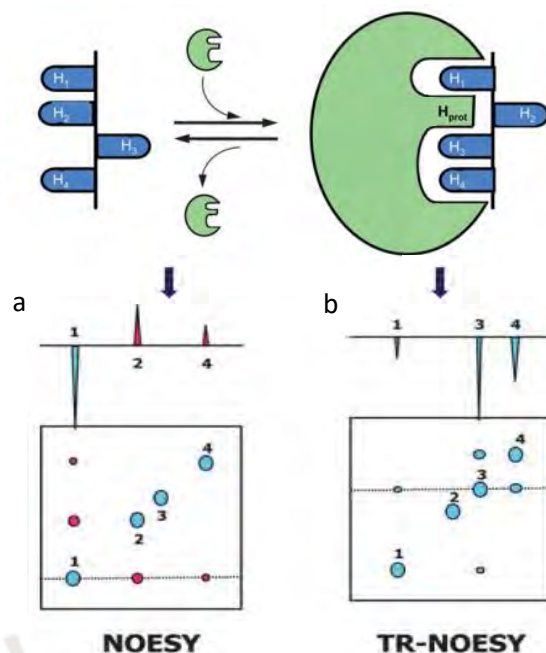


Imagen 24: Espectros NOESY y tr-NOESY cuando la molécula se encuentra libre y ligada a la proteína.
(Modificado de Unione *et al.*).⁸¹

3.2.2. Diferencia de transferencia de saturación (STD).

Este método se basa en la transferencia de la magnetización de un hidrógeno de la proteína hacia uno del ligando mediante efecto NOE (imagen 25), lo cual repercutirá en un cambio en el espectro del ligando, evidenciando así la unión entre ambos.⁷² El procedimiento consiste en comparar dos espectros, uno de control (también llamado “fuera de-resonancia”), el cual se obtiene analizando una solución que contenga a la proteína y al potencial ligando en relaciones de entre 1:50 hasta 1:1000 y un segundo espectro luego de haber saturado a la proteína de la solución anterior (conocido como “en resonancia”).^{72,82}

Para obtener el segundo espectro (*en-resonancia*) se satura selectivamente a un tipo de hidrógeno de la proteína, para ello resulta indispensable que los protones del ligando no se vean afectados. Por este motivo, se irradian los hidrógenos pertenecientes a metilos muy poco desplazados, quienes suelen aparecer entre 0 y -2 ppm y son característicos de toda proteína plegada, los cuales transferirán la saturación a todos los hidrógenos de la proteína por efecto NOE.⁷⁴ Cuando existe una unión entre la proteína y el ligando, algunos hidrógenos de la molécula (H_b) se encontrarán a una distancia que les permite recibir la magnetización mediante efecto NOE que originalmente solo afectaba a los H_a de la proteína (lo cual es representado como el cambio de color de azul a anaranjado en la imagen 25a). Posteriormente, debido al rápido intercambio que hay entre el substrato unido y libre, éste se disociará manteniendo la saturación; como resultado, se tendrá una acumulación de los ligandos con H_b magnetizados (naranjas) en la solución. Ahora, cuando se obtenga el espectro de los ligandos en solución, la señal de H_b se verá disminuida debido a la contribución negativa por efecto NOE de los H_b anaranjados (espectro 25c). Finalmente se restan las señales de ambos espectros, lo cual elimina toda señal que no

corresponda a H_b (incluyendo a las impurezas). De esta manera, si el espectro de diferencia (25d) presenta alguna señal, significa que hubo interacción proteína-ligando.^{72,82}

Debe tenerse en consideración que solo pueden evaluarse afinidades con una constante de disociación en el rango de 1 mM-10 μ M. Evidentemente si la interacción es muy rápida, no habrá un efectivo enlace proteína-ligando. Por otro lado, si la interacción es muy lenta, se tendrá el mismo inconveniente que en tr-NOESY.⁸¹ Es importante resaltar que, en la práctica, diferentes hidrógenos del ligando se verán influenciados en mayor o menor medida según la posición que tengan en el complejo, lo que podría utilizarse como información estructural.⁸² Un aspecto que debe cuidarse bastante es que el pulso utilizado no afecte a metilos protegidos del ligando, ya que podrían detectarse falsos positivos; es por ello que se requiere el uso de técnicas complementarias.

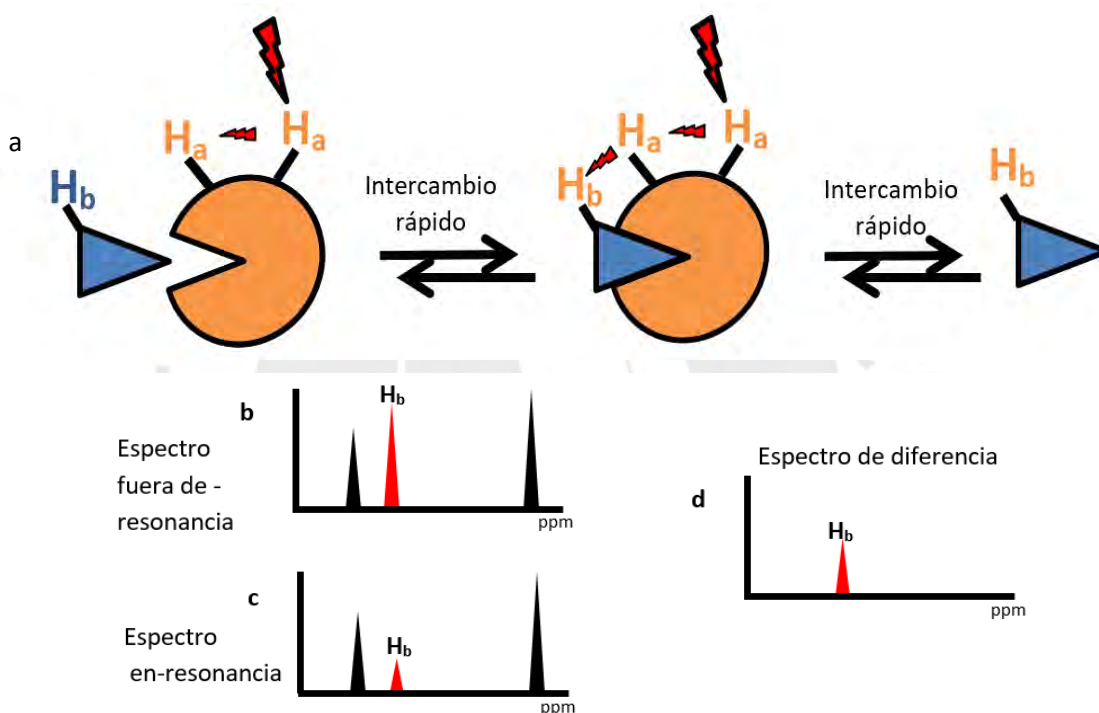


Imagen 25: Visualización esquemática del principio de la STD y de los espectros obtenidos.

Una de las ventajas de realizar STD es que permite realizar cribados con soluciones que contengan más de un ligando, la única condición límite es que las señales no se superpongan, ya que no podría interpretarse correctamente el espectro. En la imagen 26 se observa un ejemplo en donde se analizaron las interacciones de dos posibles ligandos (6- CH_3 -Trp y 7- CH_3 -Trp) con serina albúmina humana. En el espectro I_0 se observan las señales de ambas moléculas en el espectro *fuera de resonancia*. Posteriormente, en la parte inferior de la imagen 26 se aprecia el espectro de *diferencia* I_{STD} , el cual es la resta del espectro I_0 menos el de *en resonancia* (no mostrado), donde solo se dejan ver las señales de la molécula 6- CH_3 -Trp, lo que indica que es la única que se ha ligado a la proteína. De esta manera se puede discernir entre dos presuntos ligandos.⁷⁷

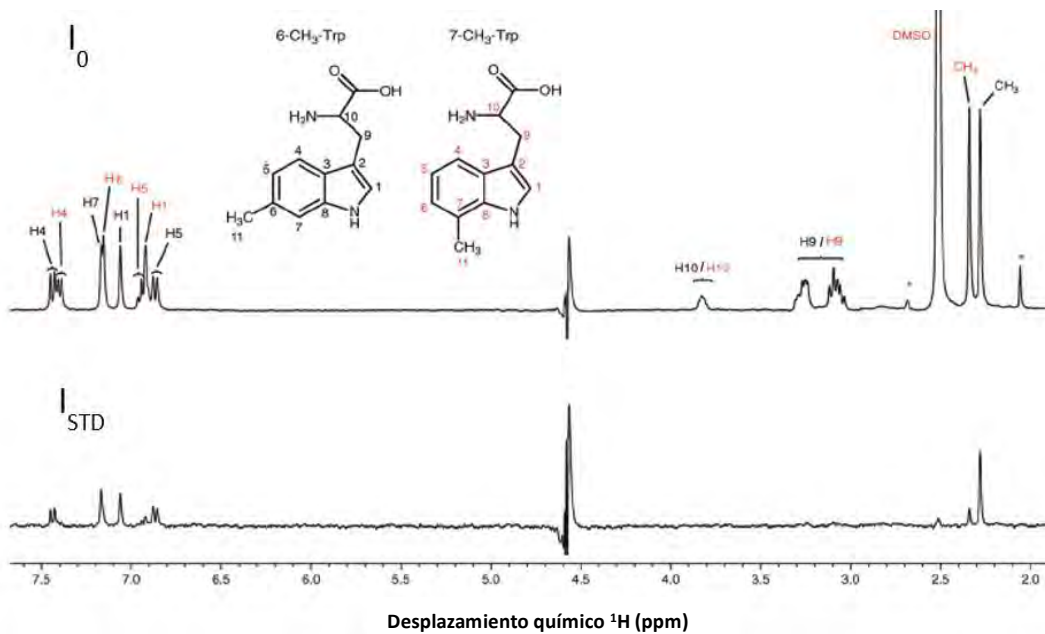


Imagen 26: Experimento STD entre serina albúmina humana y dos presuntos ligandos 6-CH₃-Trp y 7-CH₃-Trp. (Modificado de Viegas *et al.*).⁷⁷

Otra de las ventajas de esta técnica es que nos permite calcular la constante de disociación K_D . Continuando con el ejemplo anterior, se realizaron diferentes experimentos STD a diferentes concentraciones y se calculó el factor de amplificación A_{STD} según la ecuación 7 (donde se relaciona la intensidad de los espectros *fuera de-resonancia* y de *diferencia* con las concentraciones de proteína y ligando totales), obteniendo el gráfico de la imagen 27, donde se hace un seguimiento del factor A_{STD} de la señal de cada H en función de la concentración. Luego, se puede despejar el K_D de la ecuación 2, obteniendo la ecuación 8, donde a_{STD} representa el valor máximo de amplificación, obtenido del gráfico de concentraciones (imagen 27).

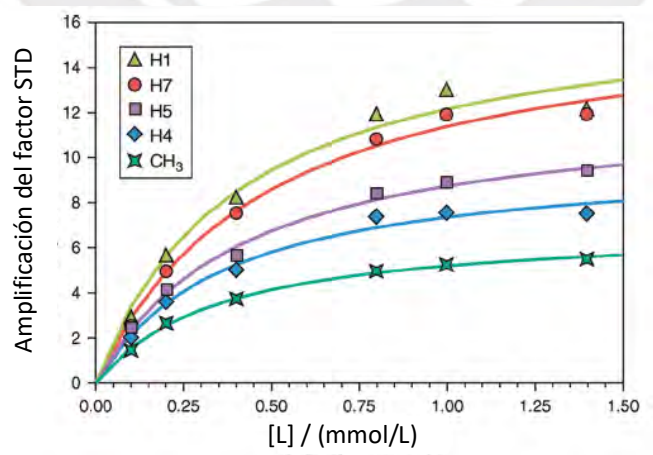


Imagen 27: Gráfico A_{STD} vs [L] para el experimento de serina albúmina con 6-CH₃-Trp. (Modificado de Viegas *et al.*).⁷⁷

Lamentablemente, las estimaciones de K_D mediante este método no son precisas, por ejemplo, en el caso propuesto se obtuvo un valor de K_D de 400 μM , el cual dista en un orden de magnitud del valor real (37 μM).⁷⁷ Se puede atribuir esta diferencia a dos factores, en primer lugar, al revisar las ecuaciones se puede notar que se está utilizando la cantidad de ligando total y no en solución (como debería ser), esto se debe a que se considera que la concentración de la proteína es tan baja, que la cantidad de ligando unido ella será despreciable. En segundo lugar, se debe considerar la posibilidad de que ocurra una segunda unión del ligando saturado que acaba de disociarse de la proteína, lo cual no permitirá una correcta medición del K_D . En todo caso, se puede tratar este cálculo como un aproximado, teniendo la necesidad de calcular la constante mediante experimentos más precisos.

$$A_{STD} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]_T}{[P]} \quad (7)$$

$$A_{STD} = \frac{\alpha_{STD} [L]_T}{K_d + [L]_T} \quad (8)$$

3.2.3. Experimento waterLOGSY.

El experimento waterLOGSY (Observación de Agua-Ligando mediante Gradiente de Espectroscopía) guarda una gran similitud con STD y tr-NOE, ya que aprovecha la transferencia de magnetización mediante efecto NOE hacia el ligando enlazado a la proteína. Sin embargo, la diferencia sustancial con el experimento anterior es que no se saturan directamente los hidrógenos de la proteína, por el contrario, se realiza un pulso de 180° a la frecuencia de los hidrógenos del agua.⁸³

Las proteínas, al encontrarse en solución, estarán rodeadas de una capa de solvatación que tiene un efecto estabilizante, ya que, en promedio, la interacción entre una molécula de agua y una proteína puede disminuir la energía libre de esta en hasta 7 kJ/mol.⁸³ Esta capa de solvatación adoptará el τ_c de la proteína y por ende estará sujeta a un efecto NOE negativo. Se aprovecha entonces la gran cantidad de agua para transferir la magnetización al ligando mediante tres mecanismos, transferencia que ocurrirá durante el tiempo de mezcla (alrededor de entre 0.8 y 1.2 s). Los tiempos de mezcla resultan un parámetro sumamente importante ya que buscan maximizar el tiempo en el que las moléculas de agua transfieran la magnetización a los ligandos, pero sin extenderse demasiado para evitar un completo relajamiento de la señal.¹² Cabe destacar que, al igual que en STD, la técnica está limitada por un intercambio rápido de la unión proteína-ligando, por lo que solo permite detectar interacciones con un rango de K_D entre 1 mM-10 μM . Por otro lado, los ligandos que no se unan a la proteína estarán sujetos a un efecto NOE positivo debido a su bajo valor de τ_c . En consecuencia, se podrán observar fases opuestas entre las señales de las moléculas que enlazaron con la proteína y las que no, debido a la diferencia de los efectos NOE experimentados (imagen 28c).

- a) Transferencia a través de la proteína: Las moléculas de agua que envuelven a la proteína se encuentran lo suficientemente cerca como para transferirle la magnetización por efecto NOE, lo que genera un efecto en cadena similar al descrito en STD, ya que la magnetización se irá

transmitiendo a lo largo de los hidrógenos de la proteína hasta, eventualmente, ser transferida al ligando si es que se encontrara enlazado (imagen 28a).

- b) Transferencia directa: Algunas moléculas de H₂O se encontrarán en el bolsillo hidrofóbico de la proteína, por lo que podrán transmitir la magnetización directamente al ligando si es que este se encuentra enlazado (imagen 28b). Este mecanismo toma relevancia cuando se trabaja con proteínas que tienen baja densidad de protones y permite trabajar con fragmentos de ADN o ARN.
- c) Transferencia mediante intercambio: Un tercer mecanismo es la posibilidad de intercambio entre hidrógenos del solvente con hidrógenos lábiles de grupos hidroxilos o aminas de la proteína. Si esto ocurre, los hidrógenos de la proteína, ahora saturados, transferirán la magnetización a lo largo de la misma, similar a lo descrito en a).

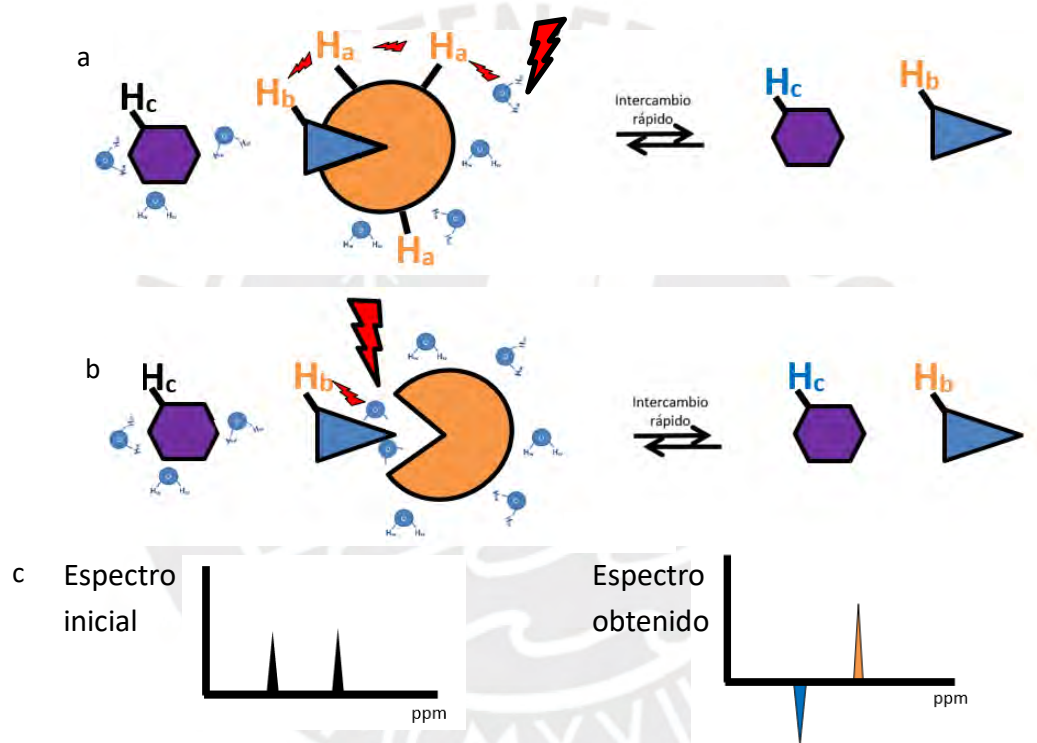


Imagen 28: Visualización esquemática de los principales mecanismos de transferencia de magnetización en el experimento waterLOGSY (a, b), así como el espectro obtenido (c).

Este experimento también permite realizar cribados de soluciones con un gran número de presuntos ligandos, siempre y cuando sus señales no se solapen e imposibiliten la lectura del espectro. En la imagen 29 se puede apreciar un experimento que involucra serina albúmina humana y dos posibles ligandos, ácido benzoico y glucosa (cuyos espectros individuales se muestran en las imágenes 29a y 29b respectivamente). En la imagen 29c se aprecia el espectro inicial que contiene los tres compuestos. Finalmente, en 29d se observa el espectro luego de haber realizado el experimento waterLOGSY, donde se evidencia claramente el cambio de fase en las señales de los ligandos, indicando que el ácido benzoico fue el único que se unió a la proteína.

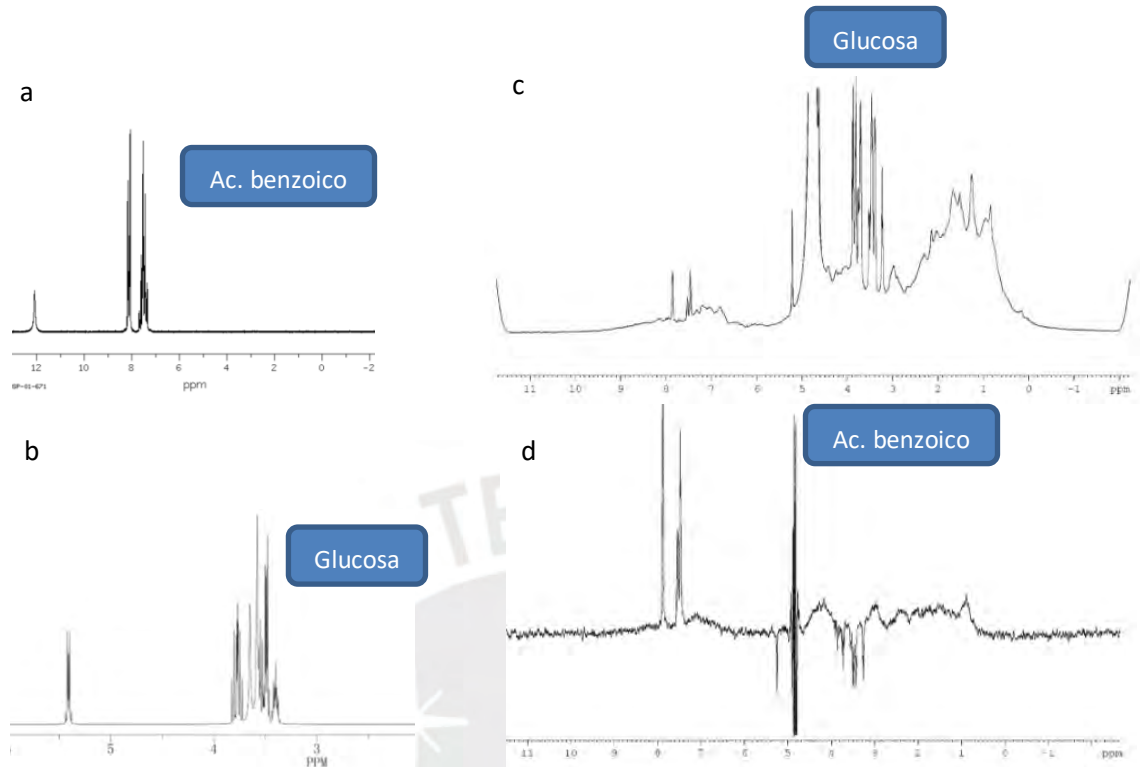


Imagen 29: (a) Espectro RMN del ácido benzoico. (b) Espectro RMN de la glucosa. (c) Espectro de una solución de ácido benzoico, glucosa y serina albúmina humana. (d) Espectro obtenido del espectro waterLOGSY de la solución c.⁸⁴⁻⁸⁶

Tanto STD como waterLOGSY son útiles debido a su carácter cualitativo, ya que mediante experimentos sumamente rápidos que pueden ser aplicados en soluciones con mezclas de varios ligandos hipotéticos, permiten identificar las moléculas que se unen a la proteína y funcionarían como potenciales inhibidores. En este sentido, ambas técnicas son complementarias debido a que, como se irradia a frecuencias distintas (en STD hacia hidrógenos menores a cero ppm y en waterLOGSY a la frecuencia del H₂O) permite diferenciar falsos positivos en caso algunos de los hidrógenos del ligando hayan sido perturbados accidentalmente por poseer desplazamientos químicos muy cercanos a la frecuencia irradiada. Por otro lado, presentan la desventaja de que solo pueden medir interacciones rápidas de disociación y los valores de K_D no son muy precisos (inclusive, según la literatura no suele calcularse el K_D utilizando waterLOGSY), es por ello que deben complementarse con otro tipo de técnicas, como CSP, que pertenece a la categoría de técnicas basadas en la proteína.

3.3. Métodos basados en la proteína

Este tipo de técnicas evalúan las interacciones proteína-ligando monitoreando los cambios en el espectro 2D ¹H-¹⁵N HSQC de la proteína. A diferencia de los métodos expuestos anteriormente, demandan mayor

trabajo previo, ya que requieren mayor cantidad de proteína, aproximadamente alrededor de 30 μM a 100 μM , además deben estar marcadas isotópicamente con ^{15}N para que puedan ser apreciadas en el espectro.⁸⁷ Al mismo tiempo, se debe disponer del espectro ^1H - ^{15}N HSQC asignado previamente para poder obtener información estructural consistente (en el caso de TcMIP ya se cuenta con este, como se evidenció en la imagen 14).

Mediante estos experimentos es posible realizar cribados con mezclas de diferentes ligandos, pero con la limitante de un análisis cualitativo, ya que para cálculos de K_D se requieren espectros donde solo se consideren la proteína y el ligando en cuestión, debido a que el entorno químico influenciará en el desplazamiento de las señales. Por otro lado, el tiempo de adquisición de los espectros 2D es largo y puede demorar entre 20 minutos y 4 horas aproximadamente, ello sumado a la gran inversión de tiempo y dinero que supone la producción de proteína marcada pueden ocasionar que las técnicas basadas en el ligando suelen ser utilizadas en compuestos que previamente han sido estudiados y seleccionados como prometedores, aunque todo dependerá del tiempo y presupuesto.^{87,88}

Por otro lado, estos métodos tienen la ventaja que permiten obtener información estructural, ya que se puede evaluar qué residuos son los que están interactuando con el ligando. Así mismo, se pueden analizar reacciones con un K_D en una mayor ventana de trabajo, teniendo como límite máximo 1 mM.^{72,87}

3.3.1. Método de Perturbación del Desplazamiento Químico (CSP).

El fundamento detrás de la técnica CSP (conocida como perturbación del desplazamiento químico o mapeo del desplazamiento químico) es simple, se basa en que las interacciones proteína-ligando alteran el desplazamiento químico (δ) de las señales de la proteína. De esta manera se adquieren una serie de experimentos 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la proteína con diferentes concentraciones del ligando (también llamado titulación), con lo cual se grafican curvas de concentración vs. δ que permiten calcular el K_D (la gran cantidad de curvas necesarias puede elevar el tiempo de adquisición del total de espectros a días).⁸⁹ Esta perturbación en el desplazamiento químico es extremadamente sensible al entorno, por lo que se debe tener mucho cuidado, por ejemplo, si el ligando se encuentra disuelto en algún solvente orgánico, ya que a medida que se realicen las titulaciones la concentración del solvente debe mantenerse constante. Si se tiene cuidado con este tipo de factores la técnica no debería mostrarnos falsos positivos, pues cualquier cambio en el desplazamiento se deberá a alguna interacción, en este sentido el rango de valores que puede tener el K_D para permitirnos la detección cualitativa es a partir de 1 mM, lo cual supone una ventaja frente a los métodos anteriormente descritos.⁸⁹

En teoría, todos los desplazamientos de las señales observadas se deben de alguna manera al efecto que produce el ligando; sin embargo, dichas interacciones no siempre corresponderán a la unión proteína-inhibidor, ya que podrían deberse a cambios conformacionales debido a un efecto alostérico o a algún fenómeno relacionado. Es por ello que necesita realizarse un tratamiento de datos para determinar cuáles son los residuos específicos que participan en el enlace, el cual consiste en calcular la desviación estándar de los desplazamientos y filtrar aquellos que se encuentren debajo de cierto valor.⁹⁰

El primer paso consiste en determinar la distancia total del desplazamiento de cada residuo, combinando sus desplazamientos en los ejes de ^1H y ^{15}N , el método más común resulta en hallar la distancia euclidiana según (9).⁸⁹ El factor α es una especie de parámetro de corrección que se utiliza para sopesar la diferencia de frecuencias a las que se encuentran los núcleos de N y H, es por ello que no existe un valor fijo para α y suele adquirir valores entre 0.1 y 0.45, aunque los estándares suelen encontrarse entre 0.14 y 0.17.^{89,90}

$$d = \sqrt{\frac{1}{2}[\delta_H^2 + (\alpha \cdot \delta_N^2)]} \quad (9)$$

Una vez que se ha calculado “d” para todos los residuos debe calcularse la desviación estándar (σ), para lo cual existen diferentes métodos y algoritmos. De todos ellos destaca el método de Schumann y colaboradores, quienes calcularon σ con todos los datos disponibles, luego excluyeron todos los valores de “d” superiores a 3σ y recalcularon una nueva σ con los valores restantes, repitiendo el proceso hasta que no quede ningún valor lo suficientemente alto como para ser excluido.⁹¹ El nuevo valor de σ será más pequeño que el original y será utilizado como filtro, si bien no resulta un criterio absoluto y genera falsos positivos, puede ser utilizado como mapeo preliminar de los residuos que interactúan ya que aparentemente el método deja escapar una baja cantidad de falsos negativos. En la imagen 30 se puede apreciar un experimento realizado por los mismos autores, en el cual se evaluó la interacción de Ras.Mg²⁺.GppNHp con Raf-RBD, en donde en la imagen de la izquierda se aprecian los residuos involucrados en la interacción en rojo (corroborados mediante cristalografía de rayos X) y en la derecha se muestran los residuos identificados mediante el método descrito, en rojo quienes coincidieron y en amarillo los falsos positivos.⁹¹

En síntesis, CSP nos brinda información estructural que debe ser complementada con otra técnica, para lo cual suelen realizarse experimentos 2D ^1H - ^1H NOESY. Esta metodología es aplicada en el desarrollo y diseño de fármacos, como se explicará más adelante.

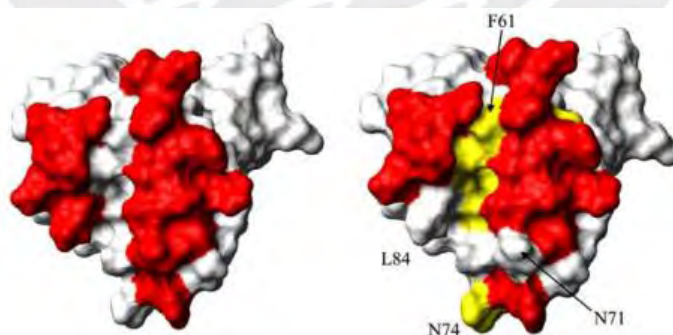


Imagen 30: Interacción entre Ras.Mg²⁺.GppNHp con Raf-RBD, en rojo se muestran los residuos que interactuaron y en amarillo los falsos positivos. A la izquierda se muestran los valores reales y a la derecha los calculados en base a σ .⁹¹

3.3.1.1. Determinación de la constante de disociación, K_D .

Una vez que se hayan obtenido los espectros a diferentes concentraciones se pueden superponer para observar patrones distintos dependiendo de cuán rápido se haya dado el intercambio. En la imagen 31a se tienen los casos extremos, donde se aprecia la transición entre el ligando libre (azul) y enlazado (rojo). A la izquierda se tiene el intercambio rápido, observándose claramente el desplazamiento que ha tenido la señal promedio, mientras que a la derecha, en el intercambio lento, lo único que se observa es el aumento o decremento de la señal. Algunos fenómenos que pueden alterar la linealidad en el caso de intercambio rápido pueden ser la formación de especies intermedias o cambios conformacionales del complejo, lo cual se reflejaría en la curva como desplazamientos discontinuos, ensanchamiento de banda o incluso desplazamientos no lineales.⁸⁹ Por otro lado, en la imagen 31b se han graficado diferentes curvas ($\Delta\delta$ vs $[L]$), donde cada una corresponde a un par diferente de proteína-ligando (diferentes casos hipotéticos, no se relacionan con los colores de los espectros 31a). A partir de esta curva se puede obtener el valor de $\Delta\delta_{max}$, el cual servirá para calcular K_D según la ecuación (10), donde $[P]_t$ y $[L]_t$ son las concentraciones de proteína y ligando total, $\Delta\delta_{obs}$ viene a ser el cambio del desplazamiento observado y n representa los posibles números equivalentes de sitios activos con la misma afinidad (para casos con diferentes sitios con diferentes afinidades el cálculo se vuelve mucho más complejo).⁸⁹

$$\Delta\delta_{obs} = \Delta\delta_{max} \left\{ (n[P]_t + [L]_t + K_D) - [(n[P]_t + [L]_t + K_D)^2 - 4n[P]_t [L]_t]^{1/2} \right\} / 2n[P]_t \quad (10)$$

Lo interesante del gráfico es que permite evidenciar los límites para los que el cálculo (cuantitativo) de K_D resulta ser preciso, el cual es -estirando los límites- entre 1 mM y 1 μ M, ya que, a partir de los extremos, el ajuste matemático resulta ineficiente. No se debe olvidar que la curva también es dependiente de $[P]$, por lo que disminuir este valor podría ayudar a tener mejores resultados; sin embargo, por cuestiones de sensibilidad de la técnica de RMN, resulta muy difícil trabajar con concentraciones de proteína por debajo de 30 μ M. Es por ello que si bien podemos observar los cambios en el intercambio lento, muchas veces no se podrá acceder al valor del K_D .⁸⁹ Finalmente, en la tabla 7 se muestra un resumen de las tres técnicas propuestas: STD, waterLOGSY y CSP, donde se comparan los factores más pertinentes en el estudio de interacciones proteína-ligando.

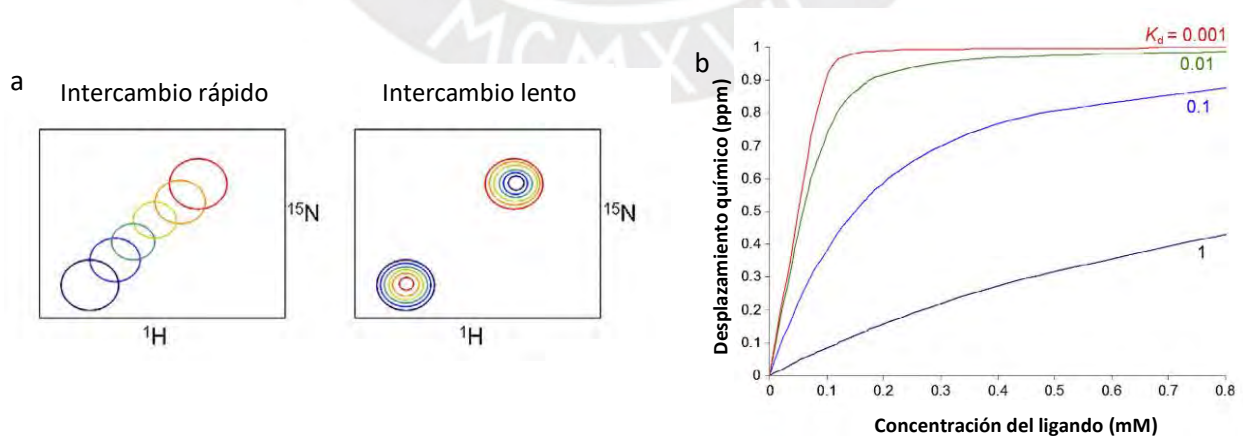


Imagen 31: (a) Vista esquemática de la superposición de espectros a diferentes concentraciones. (b) Gráfico $\Delta\delta$ vs $[L]$ de diferentes pares proteína-ligando. (Modificado de Williamson *et al.*).⁸⁹

Tabla 7: Resumen de las técnicas de estudio de interacción proteína-ligando mediante RMN propuestas

Método	Concentración de proteína	Rango de K_D para detección	Determinación K_D	Tiempo de adquisición de espectro	¿Necesita marcaje isotópico?	¿Permite realizar cribados?
STD	5-50 μ M	1 mM- 100 μ M	Aproximado	~minutos	No	Sí
WaterLOGSY	5-50 μ M	1 mM- 100 μ M	Aproximado ⁺	~minutos	No	Sí
CSP	30 μ M<	1 mM<	Preciso*	~días	Sí	Sí

⁺Según la literatura, la determinación del K_D mediante waterLOGSY es muy poco empleada

*Dentro del rango entre 1 mM y 10 μ M

3.4. Relación estructura-afinidad mediante RMN (SAR by NMR)

Existen diferentes métodos de cribado mediante los cuales se seleccionan los compuestos que se van a analizar mediante diferentes criterios. Por ejemplo, se puede partir de moléculas parecidas a inhibidores ya conocidos de la familia de la proteína en cuestión, de moléculas que hayan sido previamente validadas mediante métodos computacionales o incluso se pueden analizar bibliotecas de compuestos “a ciegas” (teniendo la posibilidad de encontrar un inhibidor que no hubiera podido ser predicho). Independientemente de la elección, dado que las técnicas mediante RMN permiten obtener información estructural, se puede utilizar esa información para modificar los ligandos validados y producir nuevos fármacos de mejor afinidad. En este sentido, SAR by NMR es una técnica utilizada para el diseño de fármacos que utiliza la información obtenida mediante experimentos CSP complementada con espectros NOE y esquemáticamente se puede resumir en los siguientes pasos, los cuales pueden visualizarse gráficamente en la imagen 32:^{87,92}

- 1) Identificación de un primer ligando con baja afinidad mediante CSP.
- 2) Identificación de los residuos involucrados en la unión y determinación de la estructura del complejo proteína-ligando mediante técnicas basadas en el efecto NOE.
- 3) Optimización química del ligando (modificación de estructura o grupos funcionales para conferirle mejor afinidad).
- 4) Identificación de un segundo ligando mediante CSP que se una a un sitio diferente al del primer compuesto, para ello deben evaluarse cambios en señales de aminoácidos diferentes a las que interaccionaban con el anterior ligando. Las pruebas pueden ser realizadas con o sin el ligando anterior, pero se recomiendan soluciones en las que la proteína ya se encuentre saturada de dicha molécula.
- 5) Determinación estructural de la nueva zona de interacción (mediante experimentos NOE).
- 6) Optimización química del segundo ligando.

- 7) Unión de ambos ligandos con el fin de incrementar la afinidad.
- 8) Corroboración de la estructura del complejo formado entre la proteína y el nuevo ligando bidentado.

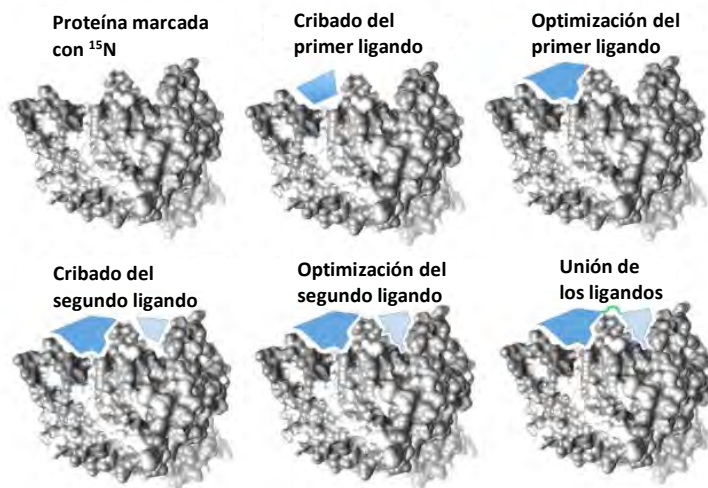


Imagen 32: Visión esquemática de la síntesis de ligandos mediante SAR *by NMR*. (Modificado de Dias *et al.*)⁸⁷

Las técnicas disponibles para establecer la correcta estructura proteína-ligando son diversas; pero en este trabajo se hará énfasis en tres de ellas que utilizan el efecto NOE, las cuales son: espectros ^{13}C - ^{15}N NOESY-HSQC, INPHARMA (NOE interligando para el mapeo farmacológico) y SAR *by* ILOEs (relación estructura afinidad mediante efecto NOE interligando).⁸⁷

Espectros ^{13}C - ^{15}N NOESY-HSQC:

Se estudia la intensidad del efecto NOE en espectros 3D compuestos por dos dimensiones provenientes de los espectros ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{15}N HSQC y una dimensión de la señal de los hidrógenos de ligando libre. La proteína debe estar marcada de manera regular y las correlaciones entre los hidrógenos del ligando y la proteína deben ser evaluados de manera selectiva hacia los protones del ligando, filtrando las interacciones intramoleculares de la proteína (representadas mediante flechas delgadas en la imagen 33). Finalmente, una señal más intensa significa que el efecto NOE recibido fue mayor, lo cual está relacionado con una menor distancia entre los hidrógenos, de esta manera se puede mapear las distancias de los protones para determinar la posición del ligando en la proteína (para más información revisar los artículos de Constantine y Breeze).^{93,94}

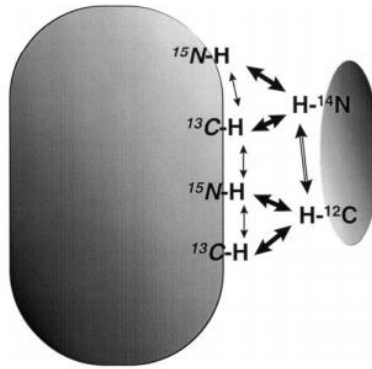


Imagen 33: Representación esquemática del efecto NOE entre el ligando y la proteína marcada con ^{13}C y ^{15}N .⁹⁴

INPHARMA:

Método basado en la transferencia de magnetización entre dos ligandos diferentes a través de la proteína. Para poder implementarlo será necesario conocer la estructura exacta de uno de los complejos proteína-ligando (para este ejemplo la estructura conocida será la que involucre al ligando A, en la imagen 34). Una vez que A se ha ligado a la proteína, sus hidrógenos transferirán parte de su magnetización a aquellos de la proteína que se encuentren a una distancia menor a 5 Å mediante efecto NOE, luego, debido a que se asume un intercambio rápido, si existe un ligando diferente que compita por el mismo sitio activo con una afinidad similar que logre enlazarse con la proteína (en este caso B), recibirá la magnetización que había sido transferida a la proteína. De esta manera, al obtener espectros tr-NOESY aparecerán señales que relacionen a ambos ligandos, lo cual indica que dichos hidrógenos, en el complejo enlazado, se encontraban en la misma posición espacial, con lo que puede recrearse la estructura de la interacción entre B y la proteína.⁹⁵

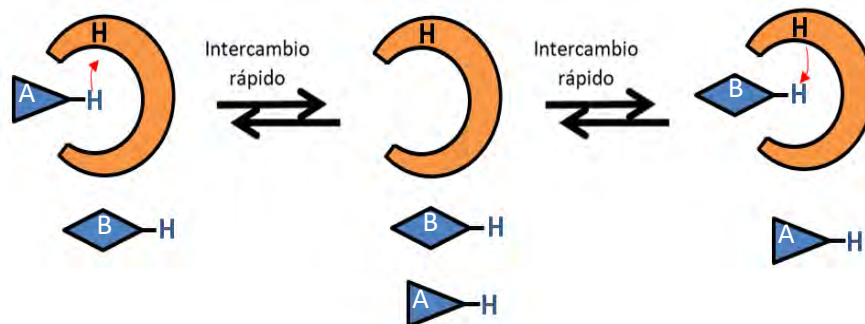


Imagen 34: Visualización esquemática de experimento INPHARMA.

SAR by ILOEs

Método que permite analizar si es que el segundo ligando interactúa con la proteína en una zona contigua a la que lo hace el primero, lo cual es de suma importancia ya que el objetivo final es unir ambos ligandos, por lo que no deben ubicarse en zonas lejanas de la proteína. La técnica se justifica en el efecto NOE, dado que la cercanía de los ligandos generará señales intensas en los espectros tr-NOESY (imagen 35). No obstante, más allá de información sobre la cercanía de los ligandos no proporciona información estructural a nivel de las anteriores técnicas mencionadas; sin embargo uno de sus puntos a favor es que puede llevarse a cabo en soluciones que contengan mezclas de presuntos ligandos.⁹⁶

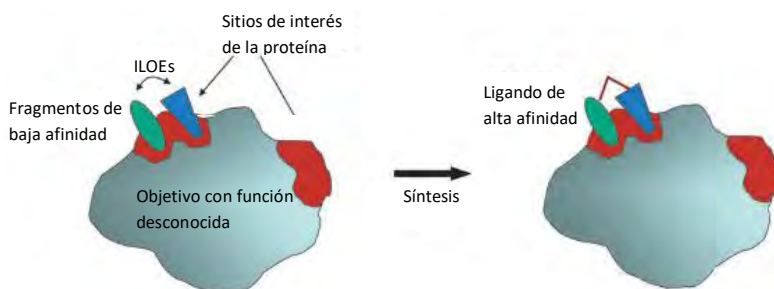


Imagen 35: Visualización esquemática de experimento SAR by ILOEs. (Modificado de Becattini *et al.*).⁹⁶

Finalmente, para poder entender el alcance de SAR by NMR se explicará el trabajo de Shuker y colaboradores, el cual consistió en la síntesis de un ligando bidentado inhibidor de FKBP12 desarrollado con este método.⁸⁸

El experimento comenzó realizando un cribado de una biblioteca de 1000 compuestos aproximadamente de bajo peso molecular mediante CSP. De entre todos los compuestos que presentaron interacciones con la proteína, el compuesto 2 (un derivado del ácido trimetoxifenil pipercolínico) fue el que tuvo mayor afinidad, con un K_D de 2 μ M (36a). La estructura del complejo FKBP12-2 fue determinada mediante ^{13}C - ^{15}N NOESY-HSQC, como se aprecia en la imagen 36b (donde los colores magenta y amarillo representan los residuos que sufrieron mayor desplazamiento) y no se modificó al compuesto 2. Luego, se procedió a la selección del segundo ligando realizando un cribado de la misma biblioteca de compuestos, pero con FKBP12 en una solución saturada con el ligando 2. De esta manera, se identificó a la molécula 3, con un K_D de 0.8 mM (los cambios en los desplazamientos de los residuos debido a la acción del compuesto 3 se evidencian en la imagen 36c, donde las señales rojas fueron obtenidas en ausencia de la molécula 3, mientras que las negras en presencia de la misma). Posteriormente, se realizaron diferentes ensayos mediante CSP para determinar las modificaciones que mejoraran el K_D de 3, obteniendo así que la molécula 9 (aquella con un H en posición orto- y un OH en posición para-) cuyo K_D disminuyó hasta 0,1 mM. La ubicación de este ligando en el complejo también se evidencia en la imagen 36b (donde los colores celeste y amarillo son los que más se desplazaron debido a la acción de 9). Se puede notar entonces que tanto la molécula 2 como la 9 interactúan en zonas próximas de la proteína, por lo que se los enlazó mediante un

conector. Diferentes conectores fueron probados produciendo los compuestos 10 a 14, todos con afinidad en el orden de decenas de nanómetros, cabe destacar que 14 fue enlazado mediante al carbono orto- al hidroxilo.⁸⁸

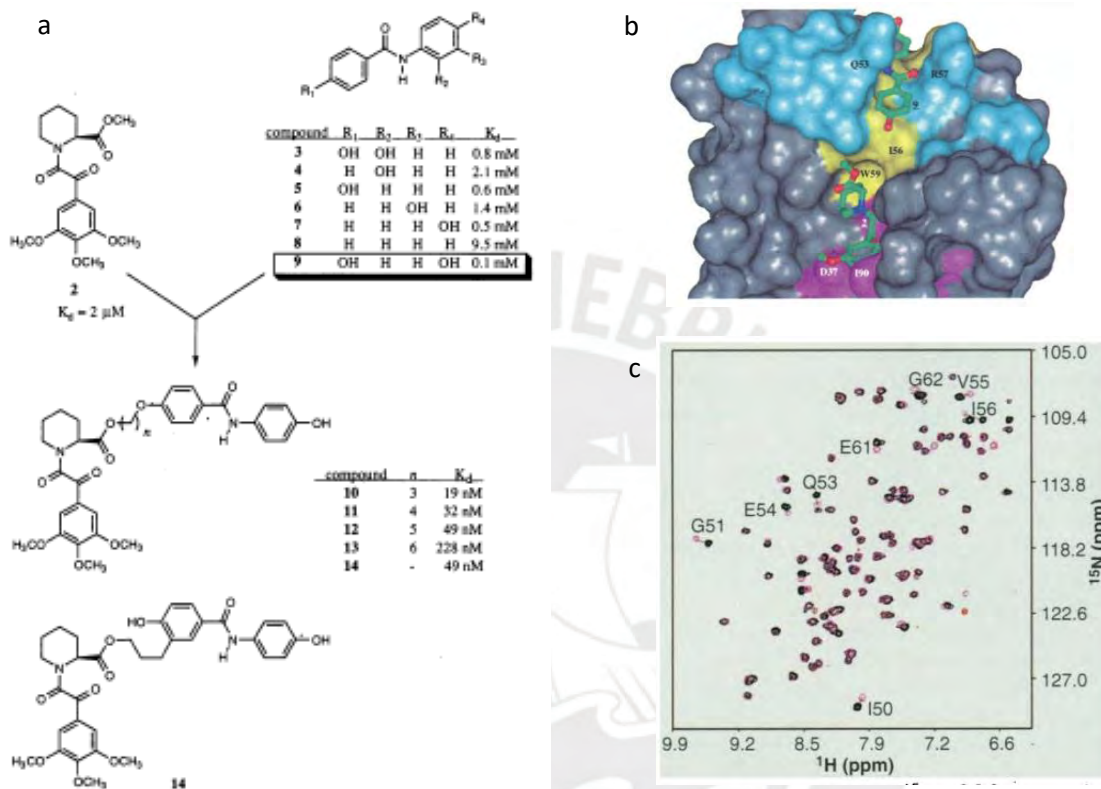


Imagen 36: Diferentes métodos utilizados por Shuker *et al.* para la síntesis de un inhibidor de FKBP12.⁸⁸

4. Conclusiones

Se puede concluir que la enfermedad de Chagas representa una compleja problemática en el continente americano, que afecta principalmente a los sectores menos privilegiados. Esta enfermedad no solo repercute en el ámbito de la salud, sino que trasciende a esferas sociales y económicas pues los infectados se ven impedidos de realizar las actividades que los sustentan. En este sentido, la ausencia de medicamentos resulta alarmante, pues los únicos dos fármacos existentes, Benznidazol y Nifurtimox, no son efectivos en la etapa crónica de la enfermedad.

Debido a esto, el desarrollo de nuevos tratamientos que permitan combatir la enfermedad debería tener un carácter prioritario en países endémicos como el nuestro. Es por ello que TcMIP, una peptidil prolil *cis/trans* isomerasa, emerge como un candidato prometedor en el desarrollo de algún fármaco, ya que se ha demostrado que es un factor de virulencia del *T. cruzi*, pues participa activamente en la infección de células huésped. En este sentido, se conoce lo siguiente: (i) Presenta un rol catalítico de isomerasa que actúa sobre los enlaces prolil. Sin embargo, al igual que otras FKBP, también podría tener funciones biológicas en base a mecanismos no catalíticos. (ii) Posee una estructura muy similar a FKBP como FKBP12 y LpMIP, lo que permite establecer analogías con ellas. (iii) Es producida exclusivamente por el estadio infectivo del tripanosoma (tripomastigote). (iv) La inhibición de TcMIP impide que los parásitos atraviesen la MEC para llegar a la célula huésped, pero no es responsable de la penetración de la membrana celular y (v) la capacidad infectiva que confiere TcMIP parece perderse si inhiben determinados factores de virulencia, lo que puede dar indicios de algún mecanismo en conjunto.

Aún falta mucho por estudiar acerca de TcMIP (y en general de las FKBP), ya que no se conoce a ciencia cierta su mecanismo, ni siquiera si sus propiedades virulentas están relacionadas con su actividad de isomerasa o con mecanismos no catalíticos, ni qué otros factores virulentos se encuentran asociados. Sin embargo, pese a esta falta de conocimiento, en base a la información recopilada de FKBP, se propone que TcMIP podría actuar isomerizando los enlaces *trans* de la triple hélice del colágeno. Lo cual la desestabilizaría y la dejaría expuesta a la acción de proteasas que lo degraden, dentro de las cuales se propone a Tc80, una serina proteasa que actúa rompiendo enlaces prolil. Sin embargo, esto no deja de ser una hipótesis y podría ser un punto de partida para investigaciones posteriores.

Independientemente de cuál sea la acción de TcMIP, dado que su inhibición tiene un efecto negativo sobre la capacidad infectiva del tripanosoma, se sugiere una serie de experimentos basados en RMN que permitan evaluar las interacciones proteína-ligando (en este caso, proteína-inhibidor). Estos experimentos son: STD, waterLOGSY y CSP, los cuales tienen un excelente carácter cualitativo y permiten obtener -en mayor o menor medida- información estructural.

STD y waterLOGSY son métodos rápidos y poco costosos, los cuales son efectivos para realizar cribados en soluciones que contengan mezclas de los inhibidores. Además, permiten obtener cierto grado de información estructural, referente a qué secciones del ligando interactúan con la proteína. Finalmente, pueden servir como un primer filtro para eliminar aquellas moléculas que no presenten interacción.

Por otro lado, CSP es un método más demandante (en términos de tiempo y costo), ya que necesita proteína marcada isotópicamente y alcanza su máximo potencial al analizar mezclas que contengan un

solo ligando. Permite obtener información estructural más robusta, pues posibilita identificar los aminoácidos de la proteína que interaccionan con el ligando, además de un cálculo más preciso del K_d . Por último, puede ser complementado con experimentos NOE para obtener información estructural precisa que pueda servir en el desarrollo de fármacos mediante metodologías como SAR *by NMR*. En síntesis, el estudio de la inhibición de TcMIP mediante técnicas de RMN supone una alternativa en el desarrollo de un nuevo fármaco contra la enfermedad de Chagas.



5. Bibliografia

1. Naghavi, M. *et al.* Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **385**, 117–171 (2015).
2. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2016 Summary Tables: Deaths By Cause, Age and Sex, By World Bank Income Group, 2000-2015. (2018).
3. Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C. W. & Solomon, A. W. Neglected tropical diseases. *British Medical Bulletin* **93**, 179–200 (2010).
4. Hotez, P. J., Fenwick, A., Savioli, L. & Molyneux, D. H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *The Lancet* **373**, 1570–1575 (2009).
5. Molyneux, P. D. H. “Neglected” diseases but unrecognised successes - Challenges and opportunities for infectious disease control. *The Lancet* **364**, 380–383 (2004).
6. Ventura-Garcia, L. *et al.* Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**, 1–8 (2013).
7. World Health Organization (WHO). *Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Third WHO report on neglected tropical diseases*, 78-79 (2015).
8. Błyszczuk, P. Myocarditis in Humans and in Experimental Animal Models. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **6**, 1–17 (2019).
9. Chao, C., Vigiliano, C. & Leone, J. Chagas disease: Historic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1866 1–15 (2020).
10. Pinheiro, E., Brum-Soares, L., Reis, R. & Cubides, J. C. Chagas disease: Review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **50**, 296–300 (2017).
11. Caldas, I. S., Santos, E. G. & Novaes, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **20**, 1797–1807 (2019).
12. Gossert, A. D. & Jahnke, W. NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **97**, 82–125 (2016).
13. Jahnke, W. Perspectives of biomolecular NMR in drug discovery: The blessing and curse of versatility. *Journal of Biomolecular NMR* **39**, 87–90 (2007).
14. World Health Organization (WHO). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record* **90**, 33–43 (2015).
15. World Health Organization (WHO). *Integrating Neglected tropical diseases into global health and development: fourth WHO report on neglected tropical diseases. Weekly Epidemiological Record*, 157 (2017).
16. Carlos Pinto Dias, J. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e*

Serviços de Saúde **25**, 1–10 (2016).

17. Angheben, A. Chagas Disease in the Mediterranean Area. *Current Tropical Medicine Reports* **4**, 223–234 (2017).
18. United Nations- Department of Economic and Social Affairs. *International Migration Report 2015: Highlights*. ST/ESA/SER.A/375, 4 (2016).
19. United Nations- Department of Economic and Social Affairs. *International Migration 2019: Report*. ST/ESA/SER.A/438, 4-9 (2019).
20. Schofield, C. J. & Galvão, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* **110**, 88–100 (2009).
21. Jurberg, J., Galvão, C., Weirauch, C. & Moreira, F. Hematophagous bugs (Reduviidae, Triatominae). en *True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics* (eds. Panizzi, A. & Grazia, J.) 353–393 (Springer Netherlands, 2015).
22. Ministerio de Salud del Perú -Oficina General de Epidemiología. Enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis Americana. en *Protocolos de la Vigilancia Epidemiológica Parte I* 9 (2005).
23. Jurberg, J. & Galvao, C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. en *Hug the Bug, for love of true bugs* 1095–1116 (2006).
24. Hieu, H. V. *et al.* Biological attributes of the kissing bug *Triatoma rubrofasciata* from Vietnam. *Parasites and Vectors* **12**, 1-10 (2019).
25. Tovar Acero, C. *et al.* New Scenarios of Chagas Disease Transmission in Northern Colombia. *Journal of Parasitology Research* **2017**, 1–5 (2017).
26. Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. W., Gidley, J. & Gibson, W. C. Trypanosomes are monophyletic: Evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology* **34**, 1393–1404 (2004).
27. De Oliveira, A. B. B., Alevi, K. C. C., Imperador, C. H. L., Madeira, F. F. & De Azeredo-Oliveira, M. T. V. Parasite-vector interaction of chagas disease: A mini-review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **98**, 653–655 (2018).
28. Zavala, J. Enfermedad de Chagas y otras tripanosomiasis. en *Parasitología médica* (ed. Becerril, M. A.) 81–89 (McGraw-Hill Medical, 2011).
29. Olsen, O. W. *Animal parasites : their life cycles and ecology*. 23 (Dover, 1986).
30. Alba Soto, C. D. & González Cappa, S. M. Trypanosoma cruzi Journey from the Insect Vector to the Host Cell. en *Chagas Disease: A Clinical Approach* (eds. Altcheh, J. & Freilij, H.) 25–59 (Springer, 2019).
31. Bocchi, E. A., Bestetti, R. B., Scanavacca, M. I., Cunha Neto, E. & Issa, V. S. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *Journal of the American College of Cardiology* **70**, 1510–1524 (2017).

32. Moscatelli, G. & Moroni, S. Acute Vector-Borne Chagas Disease. en *Chagas Disease: A Clinical Approach* (eds. Altcheh, J. & Freilij, H.) 161–178 (Springer Basel, 2019).
33. Alarcón de Noya, B. & Noya González, O. Orally Transmitted Chagas Disease: Biology, Epidemiology, and Clinical Aspects of a Foodborne Infection. en *Chagas Disease: A Clinical Approach* (eds. Altcheh, J. & Freilij, H.) 225–241 (Springer Basel, 2019).
34. Luquetti, A. O. & Schijman, A. G. Diagnosis of Chagas Disease. en *Chagas Disease: A Clinical Approach* (eds. Altcheh, J. & Freilij, H.) 141–158 (Springer Basel, 2019).
35. Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases* **1**, 92–100 (2001).
36. Bocchi, E. Exercise training in Chagas' cardiomyopathy: trials are welcome for this neglected heart disease. *European Journal of Heart Failure* **12**, 782–784 (2010).
37. Marin-Neto, J. A., Cunha-Neto, E., Maciel, B. C. & Simões, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* vol. 115 1109–1123 (2007).
38. Acevedo, G. R., Girard, M. C. & Gómez, K. A. A Panoramic View of the Immune Response to *Trypanosoma cruzi* Infection. en *Chagas Disease: A Clinical Approach* (eds. Altcheh, J. & Freilij, H.) 61–88 (Springer Basel, 2019).
39. World Health Organization (WHO). *Control of Chagas Disease. Second report of the WHO expert committee, 24-26* (2002).
40. Garcia-Bournissen, F. Clinical Pharmacology of Drugs for the Treatment of Chagas Disease. en *Chagas Disease: A Clinical Approach* (eds. Altcheh, J. & Freilij, H.) 299–312 (Springer Basel, 2019).
41. Castro, J. A., DeMecca, M. M. & Bartel, L. C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology* **25**, 471–479 (2006).
42. Olivera, M. J. *et al.* Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. *PLoS ONE* **12**, 1–13 (2017).
43. Coura, J. R. & De Castro, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 3–24 (2002).
44. Patterson, S. & Wyllie, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: Past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology* **30**, 289–298 (2014).
45. Pérez-Molina, J. A. *et al.* Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benznidazole treatment. *Acta Tropica* **127**, 101–104 (2013).
46. Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M. & Cheeseman, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5022–5027 (2008).
47. Amslinger, S. The tunable functionality of α,β -unsaturated carbonyl compounds enables their differential application in biological systems. *ChemMedChem* **5**, 351–356 (2010).

48. Thornalley, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - Role in ageing and disease. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **23**, 125–150 (2008).
49. Hall, B. S. & Wilkinson, S. R. Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**, 115–123 (2012).
50. Osorio, L., Ríos, I., Gutiérrez, B. & González, J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes and Infection* **14**, 1390–1402 (2012).
51. Villalta, F. & Rachakonda, G. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **14**, 1161–1174 (2019).
52. Shaw, P. E. Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Reports* **3**, 521–525 (2002).
53. Pereira, P. J. B. *et al.* *Trypanosoma cruzi* macrophage infectivity potentiator has a rotamase core and a highly exposed α -helix. *EMBO Reports* vol. 3 88-94 (2002).
54. Unal, C. M. & Steinert, M. Microbial Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerases (PPIases): Virulence Factors and Potential Alternative Drug Targets. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **78**, 544–571 (2014).
55. Lopez, J. M. *et al.* Backbone chemical shift assignment of macrophage infectivity potentiator virulence factor of *Trypanosoma cruzi*. *Biomolecular NMR Assignments* **13**, 21–25 (2019).
56. Moro, A., Ruiz-Cabello, F., Fernández-Cano, A., Stock, R. P. & González, A. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. *The EMBO Journal* **14**, 2483–2490 (1995).
57. Stewart, D. E., Sarkar, A. & Wampler, J. E. Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures. *Journal of Molecular Biology* **214**, 253–260 (1990).
58. Wedemeyer, W. J., Welker, E. & Scheraga, H. A. Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry* **41**, 14637–14644 (2002).
59. Fanghänel Bayer, J. & Fischer, G. Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Frontiers in Bioscience* **9**, 3453–3478 (2004).
60. Stein, R. L. Mechanism of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization. en *Advances in Protein Chemistry* (eds Anfinsen, C. ., Edsall, J., Richards, F., Eisenberg, D. & Lorimer, G.) vol. 44 1–24 (Academic Press Inc., 1993).
61. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 929–958 (2009).
62. Naranjo, T. Á., Noguera-Salvá, R. & Guerrero, F. F. La matriz extracelular: Morfología, función y biotensegridad (parte I). *Revista Española de Patología* **42**, 249–261 (2009).
63. Eberhardt, E. S., Panasik, N. & Raines, R. T. Inductive effects on the energetics of prolyl peptide bond isomerization: Implications for collagen folding and stability. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 12261–12266 (1996).

64. Kolos, J. M., Voll, A. M., Bauder, M. & Hausch, F. FKBP Ligands—Where We Are and Where to Go? *Frontiers in Pharmacology* **9**, 1–25 (2018).
65. Wagner, C. *et al.* Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cellular Microbiology* **9**, 450–462 (2007).
66. Marz, A. M., Fabian, A.-K., Kozany, C., Bracher, A. & Hausch, F. Large FK506-Binding Proteins Shape the Pharmacology of Rapamycin. *Molecular and Cellular Biology* **33**, 1357–1367 (2013).
67. Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L. & Clardy, J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **273**, 239–242 (1996).
68. Putyrski, M. & Schultz, C. Protein translocation as a tool: The current rapamycin story. *FEBS Letters* **586**, 2097–2105 (2012).
69. Wang, T. & Donahoe, P. K. The immunophilin FKBP12: A molecular guardian of the TGF- β family type I receptors. *Frontiers in Bioscience* **9**, 619–631 (2004).
70. Chen, Y., Liu, A. & Massagué, J. Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *The EMBO Journal* **2**, 4–7 (1997).
71. Huse, M., Chen, Y. G., Massagué, J. & Kuriyan, J. Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF β receptor in complex with FKBP12. *Cell* **96**, 425–436 (1999).
72. Sugiki, T., Furuita, K., Fujiwara, T. & Kojima, C. Current NMR techniques for structure-based drug discovery. *Molecules* **23**, 1–27 (2018).
73. Kleckner, I. R. & Foster, M. P. An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1814**, 942–968 (2011).
74. Ludwig, C. & Guenther, U. L. Ligand based NMR methods for drug discovery. *Frontiers in Bioscience* **14**, 4565–4574 (2009).
75. Atkins, P., de Paula, J. & Keeler, J. Magnetic Resonance. en *Atkins' Physical Chemistry* 516–517 (Oxford, 2018).
76. Gil, R. R. Residual dipolar couplings in small-molecule NMR. en *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (eds. Lindon, J., Tranter, G. & Koppelaar, D.) 946–955 (Elsevier, 2016).
77. Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L. & Cabrita, E. J. Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. *Journal of Chemical Education* **88**, 990–994 (2011).
78. Levitt, M. H. Relaxation. en *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance* 556 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
79. Keeler, J. *Understanding NMR spectroscopy*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).
80. Lundström, P. Nuclear Overhauser Effect. en *Encyclopedia of Biophysics* (eds. Gordon, C. & Roberts, K.) 1753–1759 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).

81. Unione, L., Galante, S., Díaz, D., Cañada, F. J. & Jiménez-Barbero, J. NMR and Molecular recognition. The application of ligand-based NMR methods to monitor molecular interactions. *Medicinal Chemistry Communications* **5**, 1280–1289 (2014).
82. Angulo, J. & Nieto, P. M. Espectroscopía RMN de Diferencia de Saturación (STD NMR). Aplicaciones en Química del Reconocimiento Molecular. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* **107**, 358–366 (2011).
83. Dalvit, C., Fogliatto, G. P., Stewart, A., Veronesi, M. & Stockman, B. WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability. *Journal of Biomolecular NMR* **21**, 349–359 (2001).
84. Maurer, T. NMR studies of protein-ligand interactions. en *Protein–Ligand Interactions: Methods and Applications* (ed. Guenther, U.) vol. 305 197–214 (Humana Press, 2005).
85. Chemical Book. *Benzoic acid(65-85-0) 1H NMR* (2016). Consultado el 15/07/2020 https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_65-85-0_1HNMR.htm
86. MOLBASE. *α -D-glucose* α -D-glucose (2013). Consultado el 15/07/2020 http://www.molbase.com/en/hnmr_492-62-6-moldata-1550946.html
87. Dias, D. M. & Ciulli, A. NMR approaches in structure-based lead discovery: Recent developments and new frontiers for targeting multi-protein complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **116**, 101–112 (2014).
88. Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531–1534 (1996).
89. Williamson, M. P. Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **73**, 1–16 (2013).
90. Van Ingen, H. & Bonvin, A. M. J. J. Information-driven modeling of large macromolecular assemblies using NMR data. *Journal of Magnetic Resonance* **241**, 103–114 (2014).
91. Schumann, F. H. *et al.* Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions. *Journal of Biomolecular NMR* **39**, 275–289 (2007).
92. Pellecchia, M., Sem, D. S. & Wüthrich, K. NMR in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 211–219 (2002).
93. Constantine, K. L., Davis, M. E., Metzler, W. J., Mueller, L. & Claus, B. L. Protein-ligand NOE matching: A high-throughput method for binding pose evaluation that does not require protein NMR resonance assignments. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 7252–7263 (2006).
94. Breeze, A. L. Isotope-filtered NMR methods for the study of biomolecular structure and interactions. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **36**, 323–372 (2000).
95. Sánchez-Pedregal, V. M. *et al.* The INPHARMA method: Protein-mediated interligand NOEs for pharmacophore mapping. *Angewandte Chemie - International Edition* **44**, 4172–4175 (2005).
96. Becattini, B. & Pellecchia, M. SAR by ILOEs: An NMR-based approach to reverse chemical genetics. *Chemistry - A European Journal* **12**, 2658–2662 (2006).