

CAPÍTULO V

Señalización molecular de tripanosomátidos: quinasas como potenciales blancos terapéuticos y su mecanismo de silenciamiento post-transcripcional

Andrés Felipe Díez Mejía*

<https://orcid.org/0000-0002-0188-2928>

Marcel Marín Villa**

<https://orcid.org/0000-0001-5116-493>

Rubén Eduardo Varela Miranda***

<https://orcid.org/0000-0002-1635-0166>

Abstract. The kinases have been described as a group of enzymes responsible for the emission and transduction of signals in the cell, generating responses ranging from the regulation of cellular homeostasis, to the control of the response to external stimuli. Given the importance of these proteins, reported in many cases as essential, it has been considered that they can be good therapeutic targets in the treatment of human pathologies such as cancer. In recent

* Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
✉ andresfelipediez10@gmail.com

** Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia
✉ marcel.marin@udea.edu.co

*** Universidad Santiago de Cali
Cali, Colombia
✉ ruben.varela00@usc.edu.co

Cita este capítulo

Díez Mejía AF, Marín Villa M, Varela Miranda RE. Señalización molecular de tripanosomátidos: quinasas como potenciales blancos terapéuticos y su mecanismo de silenciamiento post-transcripcional. En: Vera Lizcano O, editora científica. *Plasmodium, Trypanosoma y Salmonella: Marcadores moleculares*. Cali, Colombia: Editorial Universidad Santiago de Cali; 2020. p. 147-184.

years, the investigation of kinases as therapeutic targets in the context of cancer has been extrapolated to the search for chemotherapeutic alternatives to combat parasitic diseases such as leishmaniasis and trypanosomiasis, finding proteins of the PI3K pathway as targets. promising AKT kinase, involved in various cell signaling pathways such as PI3Ks and whose main function is the promotion of cell survival in stress conditions, has been proposed as a candidate target for the development of therapeutic alternatives for the treatment of diseases produced by trypanosomatids with promising results to date, for which the functional characterization and experimental validation of AKT is necessary for the development of drugs and chemotherapeutic alternatives.

Resumen. Las quinasas han sido descritas como un grupo de enzimas encargadas de la emisión y transducción de señales en la célula, generando respuestas que van desde la regulación de la homeostasis celular, hasta el control de la respuesta a estímulos externos. Dada la importancia de estas proteínas, reportadas en muchos casos como esenciales, se ha considerado que pueden ser buenos blancos terapéuticos en el tratamiento de patologías humanas como el cáncer. En los últimos años, la investigación de las quinasas como blancos terapéuticos en el contexto de cáncer se ha extrapolado a la búsqueda de alternativas quimioterapéuticas para combatir enfermedades parasitarias como la leishmaniasis y la tripanosomiasis, encontrando a las proteínas de la vía de las PI3Ks como dianas prometedoras. La quinasa AKT, involucrada en diversas rutas de señalización celular como la de las PI3Ks y cuya función principal es la promoción de la supervivencia celular en condiciones de estrés, ha sido propuesta como un blanco candidato para el desarrollo de alternativas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades producidas por tripanosomátidos con resultados promisorios hasta la fecha, por lo cual se hace necesaria la caracterización funcional y validación experimental de AKT para el desarrollo de fármacos y alternativas quimioterapéuticas.

Palabras clave: Tripanosomátidos, AKT, quinasa, PI3K, estrés.

Introducción

Las proteínas quinasas y fosfatasas

Las proteínas quinasas y fosfatasas son un amplio grupo de enzimas que catalizan la adición o eliminación de grupos fosfato a sus sustratos respectivamente. Diversos autores se refieren a estas como los principales protagonistas de un gran porcentaje de las vías de señalización y transducción de señales en las células. Gracias a la disponibilidad de datos genómicos, alrededor de 2000 quinasas y fosfatasas han sido reportadas en humanos, de las cuales se han descrito funciones que comprenden desde la regulación de la actividad y la homeostasis celular, hasta el control de la respuesta a estímulos externos [1, 2].

Desde hace más de 40 años se conoce que la actividad de quinasas comprende un complejo conjunto de procesos celulares como la migración de proteínas hacia y desde núcleo de la célula hasta la membrana y citoplasma de la misma, el control temporal de señales de fosforilación y desfosforilación, además de la regulación de cascadas multicíclicas que responden a diferentes estímulos. Entre las quinasas y fosfatasas, existe un diálogo de activación y de desactivación como en el caso de las serina/ treonina quinasas y fosfatasas, en donde el estatus de fosforilación de sus residuos serina, treonina o ambos puede o no promover el paso de un estado de represión a uno de activación y viceversa [4].

En resumen, las proteínas quinasas y fosfatasas tienen un rol protagonista en el balance de activación y desactivación de otras proteínas que promueve respuestas celulares diversas. Dicha importancia ha sido evidenciada por el hecho de que un gran número de estas enzimas se han reportado como esenciales para las células y se encuentran con frecuencia respaldadas por un alto número de copias de los genes que las codifican [5]. A lo anterior se suma el hecho de que muchos de los factores de supervivencia y virulencia de algunos virus han sido reportados como quinasas capaces de regular vías de señalización dentro de su célula hospedera y al estar ausentes en dichos patógenos, estos pierden su capacidad infectiva e incluso su viabilidad [1, 2].

Gracias al uso de inhibidores específicos de quinasas y fosfatasas entre otras herramientas moleculares, se ha logrado describir el papel

particular de estas proteínas en diferentes organismos y líneas celulares, mostrando que el balance de las quinasas y fosfatasa es complejo y variable en cada tipo de célula [5]. Como ejemplo del protagonismo de estas proteínas, tenemos el grupo de las proteínas quinasas y fosfatasa serina/treonina, que están en constante actividad de adición y remoción de grupos fosfato en los residuos de serina y treonina de las subunidades y dominios catalíticos y de regulación de sus sustratos, mostrando actividad en procesos celulares de metabolismo como la síntesis o degradación de moléculas portadoras de energía, así como la participación en la respuesta inmediata a estímulos hormonales y la señalización generada en respuesta a estímulos de estrés [1, 2].

Otro proceso en el cual las quinasas han sido ampliamente involucradas es el control de la división celular y la señalización inherente a la activación del ciclo celular, en donde la presencia de mitógenos detona toda una red de quinasas particulares denominadas MAPK o por sus siglas en inglés: *Mitogen-activated protein Kinase*, las cuales captan la señal del mitógeno y lo traducen en una serie de fosforilaciones secuenciales que se traducen en una comunicación transcitoplasmática hacia el núcleo, promoviendo la activación de diversos factores de transcripción que activan la división celular [6]. Estas vías son particularmente conservadas en células eucariotas e involucra una gran diversidad de señales y respuestas de fosforilación desfosforilación acopladas.

Basados en lo anterior, debemos entender que la regulación de muchos procesos celulares no depende exclusivamente de las fosforilaciones generadas por las quinasas, sino que también debe existir un balance con respecto a las desfosforilaciones promovidas por las fosfatasa, mostrando un panorama aún más complejo que dirige toda una configuración de adición y eliminación de grupos fosfato que desencadenan la respuesta a un estímulo exógeno o un proceso celular [1, 2].

Es interesante agregar, que la complejidad del sistema de transducción de señales e interpretación de estímulos y segundos mensajeros, no solo está dada por el sistema de fosforilación o desfosforilación, sino que también está basado en el correcto acoplamiento entre este sistema y el enorme complejo de proteínas denominadas factores de transcripción,

las cuales reconocen determinados patrones de secuencias en el ADN y desencadenan una serie de respuestas que van desde el aumento o disminución de la transcripción de genes particulares, hasta la supresión total o aumento significativo de los mismos. Este hecho ha sido muy bien estudiado en los modelos de activación y desarrollo de memoria en líneas celulares del sistema inmune [7].

Los quinomas de tres tripanosomátidos patógenos de humanos

En el 2005, fue publicado el quinoma comparativo de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*, los agentes etiológicos de la enfermedad de chagas o tripanosomiasis americana, la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana y la leishmaniasis cutánea respectivamente [8]. Estos patógenos comprenden ciclos de vida complejos que involucran tanto hospederos mamíferos como insectos vectores, en donde la temperatura, el pH y la exposición a productos reactivos del oxígeno promueven una evidente necesidad del control de la interpretación de señales y factores extracelulares, así como una estricta regulación de sus ciclos celulares y del metabolismo dependiente de los diversos ambientes ofrecidos por cada uno de sus hospederos [9].

Basados en las respuestas que los parásitos deben generar frente a los diferentes ambientes encontrados en sus hospederos, además de la regulación de sus ciclos de vida que comprenden diferentes formas o estadios celulares, estos organismos deben tener un sistema de señalización complejo que en parte podría ser soportado por una red de familias de quinasas encargadas de la transducción de señales. Se ha reportado que los tres parásitos cuentan con casi 30% de las quinasas descritas en el genoma de humanos, dentro de las cuales se encuentran las quinasas denominadas como típicas de eucariotas (eKPs), así como las denominadas atípicas (aKPs). Los análisis bioinformáticos derivados del quinoma de estos organismos, revelaron que los genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*, tienen 176, 190 y 199 quinasas respectivamente, de las cuales se calcula que la mayoría son ortólogas a través de las especies [8].

Con respecto a las quinasas de humanos, los tripanosomátidos carecen de las de tipo tirosina quinasa y en consecuencia de la familia de

receptores tipo tirosina quinasa, que son grupos de enzimas descritos por tener un papel muy importante en la respuesta a estímulos de factores de crecimiento, señales de muerte celular programada, entre otros procesos relevantes en células humanas. Sin embargo, se ha encontrado que estos parásitos poseen quinasas de doble especificidad denominadas Dual-Specificity Kinases (DSKs), las cuales funcionan tanto como serina/treonina quinasas, así como tirosina quinasas, es decir, que pueden fosforilar sustratos tanto en los residuos serina y/o treonina, así como en tirosina [8, 10].

Con respecto a lo anterior, se han descrito pocas vías de señalización en estos parásitos y dada la carencia de receptores de superficie típicos como los acoplados a señalización por proteínas G, se ha postulado que estos organismos tienen mecanismos de señalización divergentes y poco comunes respecto a lo que ha sido descrito para mamíferos. Sumado a esto, se sabe que los tripanosomátidos en general realizan una transcripción global de la mayoría de sus RNA mensajeros (mRNA), evidenciando una aparente falta de regulación transcripcional y, en consecuencia, un aumento de los procesos de regulación postranscripcionales y traduccionales. En ese sentido, se ha descrito que el sistema de regulación basado en quinasas usualmente desencadena el control de la transcripción a través del reclutamiento o activación de factores de transcripción, lo que refuerza la idea que la interpretación de señales basada en un sistema de fosforilación y desfosforilación en mamíferos y tripanosomátidos es divergente y puede desencadenar funciones de regulación muy distintos [8, 11].

Adicionalmente, estos parásitos han sufrido una expansión de familias de quinasas como las CMGC, dentro de las que se encuentra la familia de quinasas que comprende las MAPKs que responden a señales de crecimiento y estrés celular; las quinasas CDK o quinasas dependientes de ciclina, encargadas de procesos de regulación del ciclo celular y algunos procesos de control de metabolismo energético y control del *splicing*. También se ha evidenciado una expansión de la familia de quinasas STE, las cuales dan lugar a los pasos iniciales de activación de las MAPK o quinasas activadas por mitógeno traduciendo señales de la superficie de la célula al núcleo y una expansión de la familia de quinasas NEK, relacionadas con el control del ciclo celular y el ingreso

a puntos de chequeo dentro del mismo. Finalmente, se ha encontrado un gran número de quinasas que no muestran relación con ningún grupo conocido o reportado en humanos (aKPs), y se ha predicho que muchas de estas proteínas tienen un alto contenido de dominios transmembrana que hacen que este grupo sea clasificado como perteneciente a quinasas raras de tipo receptor de membrana [8].

Por otra parte, se encontró que aproximadamente el 2% del genoma de estos parásitos codifica para proteínas de tipo quinasa, sugiriendo que los mecanismos de fosforilación hacen parte de procesos fundamentales dentro de la biología de estos organismos. A pesar que por análisis bioinformáticos se han logrado establecer las categorías funcionales de muchas de estas quinasas, aun no queda claro cuál es la función o el posible rol de un gran porcentaje de las mismas mediante el análisis exclusivo de similitud de secuencias, por lo cual, el desarrollo de estudios y trabajos relacionados con el entendimiento de las redes de fosforilación y en general el entendimiento funcional de las quinasas de estos parásitos es necesario [8].

El entendimiento de las quinasas que tienen alta similitud de secuencia con las humanas y el de las denominadas quinasas raras, abre las puertas al encuentro de nuevos blancos terapéuticos mediante el empleo de medicamentos de uso conocido y el advenimiento de nuevos genes blanco que se encuentran ausentes o son altamente divergentes en los genomas de sus hospederos mamíferos.

El panorama de las PI3Ks y su papel en el contexto de los tripanosomátidos

La vía de señalización de las fosfatidil inositol quinasas (PI3Ks), es en la actualidad una de las más populares en la investigación relacionada con cáncer dado que se ha asociado a múltiples tipos de patologías relacionadas con el crecimiento anormal de las células. Algunas compañías farmacéuticas consideran que los integrantes de la vía PI3K son excelentes blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos y en ese sentido, las investigaciones han llegado a tal punto que actualmente existen fármacos que pueden inhibir miembros puntuales de esta vía disminuyendo así el riesgo de efectos secundarios adversos [12].

Se ha descrito que las células cancerígenas son comparables, en el contexto de las estrategias de supervivencia, con parásitos protozoarios que promueven la captación de nutrientes de su hospedero e incluso pueden generar mecanismos de resistencia a medicamentos y ser tolerantes a los retos que promueven procesos de estrés y daño celular [13]. En ese sentido, algunos investigadores han propuesto la idea que el uso de fármacos disponibles actualmente para el tratamiento del cáncer, podría funcionar como alternativa para el tratamiento de enfermedades generadas por parásitos. Por ejemplo, si se inhibe la vía PI3K o alguno de sus componentes que en general están asociadas con supervivencia celular ante estímulos de estrés, se puede llegar a potenciar el daño sobre células cancerígenas y este efecto puede ser extrapolable sobre las poblaciones de algunos parásitos. En ese sentido, tratamientos existentes para inhibir la vía PI3K en cáncer, podrían funcionar también con parásitos y ahorrar tiempo y costo de investigación en el desarrollo de nuevos tratamientos [14].

A finales del 2009, fue publicado el quinoma de las PIK relacionadas con la vía de señalización activada por fosfatidil inositol en tripanosomátidos, denominado el *TryPIKinoma*. Este quinoma fue realizado mediante el uso de análisis bioinformáticos en los cinco principales tripanosomátidos patógenos de humanos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Leishmania brasiliensis* y *Leishmania infantum*, gracias a la disponibilidad de las secuencias de sus respectivos genomas. El proyecto fue llevado a cabo con el objetivo de entender en detalle la vía de las PI3K de estos parásitos dado que es crucial en numerosos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular, siendo activada por numerosos estímulos que desencadenan respuestas ante el estrés celular, la detoxificación de fármacos entre otras. Así el conocimiento de los elementos protagonistas de esta vía, podrían dar ideas del desarrollo de nuevos fármacos basados en el entendimiento de las PI3Ks como blancos terapéuticos prometedores [15].

A pesar de que la vía de las PI3Ks es altamente conservada en eucariotas, el desarrollo del TryPIKinoma permitió confirmar que los Tripanosomátidos no poseen el sistema clásico de tirosin quinazas, que como se mencionó, se han asociado a funciones de transducción de señales desde el entorno extracelular hacia el núcleo, comportándose en su mayoría como receptores de membrana acoplados a señalización por

proteínas G, que posteriormente desencadenan cascadas de señalización sobre las PI3Ks [15]. En ese sentido, una pregunta que permanece sin responder es ¿Cómo estos parásitos responden a la carencia de receptores y de quinasas tipo tirosina quinasas?

Se han propuesto algunas hipótesis acerca de la presencia de quinasas de función dual o receptores no convencionales en estos parásitos, sin embargo una de las conclusiones a las que se ha llegado con el desarrollo de diferentes análisis sobre las quinasas de estos organismos es que el sistema de fosforilación en tripanosomátidos y otros parásitos como *Schistosoma mansoni* es diferente al encontrado en células de mamífero pero responde a la necesidad de señalización de los mismos procesos que desencadenan una respuesta [8, 10, 16]. A pesar de las divergencias encontradas entre los sistemas de tripanosomátidos y las células de mamífero, se ha propuesto clasificar estas quinasas dentro de grupos o modelos de función particular teniendo en cuenta los análisis realizados sobre organismos vertebrados e invertebrados en donde las PI3Ks se dividen en grupos y clases de acuerdo a la homología de sus secuencias y dominios, la especificidad por sustratos y su regulación [15, 16].

De acuerdo a la clasificación de las PI3Ks propuesta para *Schistosoma mansoni* se proponen cinco grupos divididos de acuerdo a la presencia y similitud de sus dominios funcionales de la siguiente manera: El modelo 1, que agrupa PI3Ks relacionadas con funciones de formación de vesículas y transporte celular, tráfico de membranas, procesos de endocitosis, formación de lisosomas y reciclaje celular. El modelo 2, que agrupa a las PI3Ks relacionadas con supervivencia celular, transducción de señales a través de segundos mensajeros y activación de quinasas centrales como la AKT, que promueve procesos de supervivencia celular. Los modelos 3 y 4 se han caracterizado por agrupar a las fosfatidil inositol 4 quinasas o PI4Ks, las cuales están relacionadas con el tráfico de membranas, la morfología celular, la polarización de actina, la regulación del citoesqueleto, la morfología de vacuolas, algunas funciones secretoras y la activación de las Map-quinasas que juegan papeles importantes en la regulación del ciclo celular y en particular en el control de la mitosis. Finalmente, el modelo 5, que agrupa a las quinasas mediadoras de interacciones entre proteínas y también a las PI3Ks relacionadas con la activación dependiente de fragmentos de DNA generado por daño

y que posteriormente activan puntos de chequeo del ciclo celular y en consecuencia vías de reparación. Estas quinasas activan a las proteínas mTor, las cuales son las enzimas centrales de los complejos mTorc1 y mTorc2, encargados de la regulación de procesos de crecimiento celular, la síntesis de proteínas y la supervivencia celular [15, 16].

Como se mencionó, el conocimiento de las PIKs podría desencadenar el uso de medicamentos o inhibidores contra estas quinasas y podría ayudar a mitigar los problemas causados por los tripanosomátidos a través del uso del conocimiento adquirido en otras patologías como esquistosomiasis e incluso cáncer. Las enfermedades causadas por tripanosomátidos son complejas y han sido asociadas con diferentes factores que involucran condiciones socioeconómicas precarias, la posición geográfica, el estatus inmunológico de la población y la ocurrencia de fenómenos de resistencia a medicamentos. Por lo cual se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a mitigar los impactos de estas patologías [17].

Al realizar el análisis genómico de estos parásitos con el objetivo de encontrar las posibles PI3Ks y sus funciones putativas, los candidatos encontrados fueron agrupados en los modelos mencionados anteriormente y se observó que el arreglo de las PI3Ks en los cromosomas de los parásitos no es aleatorio y existen bloques génicos que codifican para PI3Ks en una disposición espacial altamente sinténica entre tripanosomátidos [15, 16]. Con respecto a los modelos propuestos, este análisis también reveló la presencia de PI3Ks del modelo 1 de las cuales no se ha caracterizado o corroborado su función experimentalmente hasta la fecha. Adicionalmente, fueron encontradas PI3Ks pertenecientes al modelo 5 que están involucradas con reparación y respuesta al daño en el ADN, el crecimiento y metabolismo celular. Estas quinasas fueron caracterizadas como altamente conservadas entre tripanosomátidos y otros eucariotas en donde se ha propuesto el uso de inhibidores específicos que alteran el funcionamiento de estas. Basados en lo anterior, se propuso a la wortmanina, un fármaco ampliamente usado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como un potente inhibidor de las PI3Ks del grupo 5 en estos parásitos, dado que actúa inhibiendo la función de muchas quinasas conservadas de este grupo al unirse a los residuos de lisina de los sitios catalíticos de unión a

ATP. Esta hipótesis, ya ha sido corroborada experimentalmente y se propone a la wortmanina como un posible nuevo tratamiento contra las patologías causadas por estos parásitos [15, 16]. La importancia de la wortmanina como fármaco inhibidor de las PIK en tripanosomátidos se ha observado cuando se tratan amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi in vitro* y se ve afectado el ingreso de los parásitos a las células hospederas, alterando su infectividad y capacidad de invasión. Lo anterior sugiere que no solo el análisis de las PI3ks ha ayudado a entender la biología de estos parásitos, sino también que el uso de un medicamento ya avalado podría mejorar el tratamiento usado para combatir las enfermedades producidas por tripanosomátidos [18].

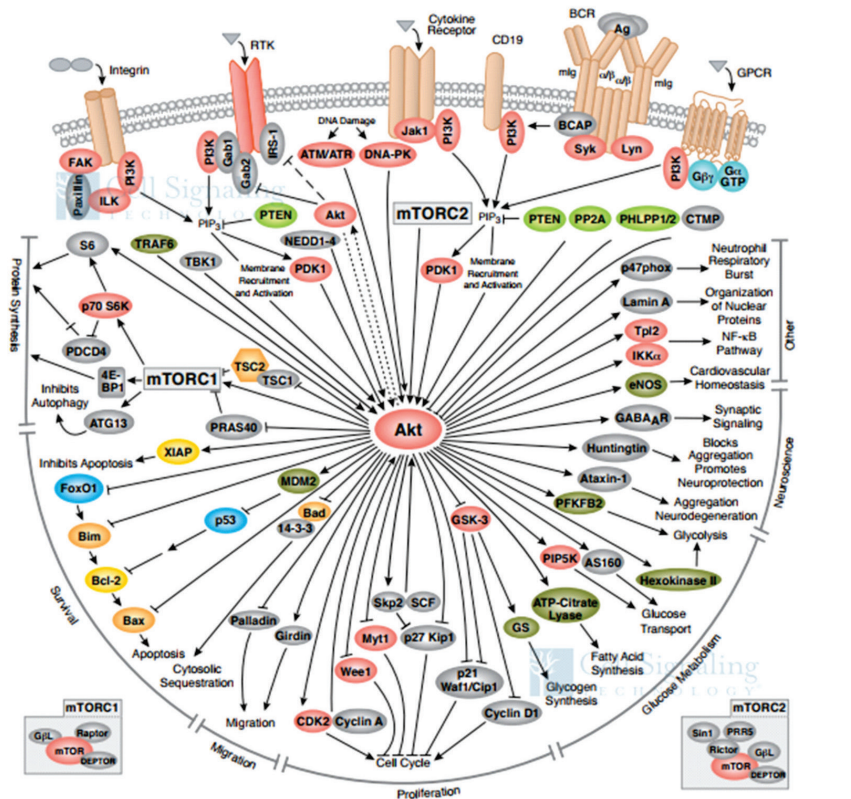
Son pocas las vías de señalización por PI3Ks caracterizadas en tripanosomátidos, sin embargo, se ha logrado establecer por análisis funcionales el rol protagonista de los integrantes de los procesos establecidos para los modelos de fosforilación 1 y 5 mencionados anteriormente en *T. cruzi* y *T. brucei*, demostrando que las quinasas pertenecientes a este grupo son consideradas como posibles buenos blancos terapéuticos [15, 16].

En *T. cruzi* se sabe que la sobre expresión de algunas PI3Ks del modelo 1 desencadena cambios en la estructura y formación de las membranas; por otro lado, se sabe que las PI3Ks pertenecientes al modelo 5, relacionadas con las quinasas mTor que son activadas a su vez por otras PI3Ks, tienen un papel relevante en el control del crecimiento celular, la modulación de la formación del citoesqueleto y la citoquinesis. En este caso, el uso de la rapamicina, un potente inhibidor de los integrantes del complejo mTORc2, encargado del control de la formación del cito esqueleto, promueve una fuerte acción tóxica en estos parásitos, disminuyendo su proliferación e impidiendo la formación de complejos proteicos [15, 16, 19]. Es interesante añadir, que a pesar de la falta de datos experimentales que describan la función de las PI3Ks pertenecientes a los modelos 2, 3 y 4 en estos parásitos, se puede especular que estas quinasas están encargadas de múltiples procesos y que pueden tener roles centrales en la supervivencia y homeostasis celular como se mostró en el caso de las proteínas de los médelos 1 y 5 [20].

Uno de los integrantes más interesantes de la vía de señalización de las PI3Ks, es la quinasas AKT/PKB, la cual se encuentra en una posición

central que conecta a varias de las vías propuestas para los distintos modelos discutidos, Figura 1.

PI3 Kinase/Akt Signaling



Pathway Diagram Key

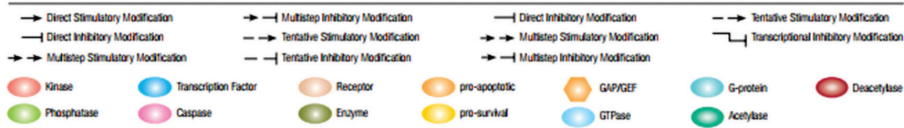


Figura 1. Vías de señalización en las cuales participa la serina treonina quinasa AKT como nodo central y los procesos celulares sobre los cuales tiene algún tipo de señalización en el modelo de células eucariotas humanas.

Fuente: Tomado de Cell Signaling Technology, inc.

Esta quinasa es reclutada a la membrana celular en modelos de células humanas luego de ser activada una señal por un receptor de membrana (lo cual como se ha mencionado, no ha sido bien caracterizado en tripanosomátidos) [15,16]. Esta señal está dada por la formación de PIP3, que permite que AKT esté disponible para ser fosforilada por otras quinasas como las denominadas PDKs. Al ser activada, AKT realizará una serie de fosforilaciones de otras quinasas presentes en el resto de modelos, regulando procesos como la inhibición de la apoptosis, el crecimiento, la síntesis de proteínas, la proliferación y la autofagia [15,16]. Basados en lo anterior, el análisis genómico comparativo de estos patógenos, permitió la visualización de nuevos blancos genéticos con potencial terapéutico y se logró entender un poco más sobre la biología de estos parásitos. Las PI3Ks y proteínas centrales como la AKT que conectan diferentes modelos y vías de señalización como coordinadores maestros, son blancos terapéuticos atractivos para el tratamiento no solo de cáncer sino también de las enfermedades producidas por estos parásitos.

AKT, un blanco terapéutico prometedor

En humanos, la proteína quinasa B o AKT se ha caracterizado como una serina/treonina quinasa que en presencia de ATP tiene la capacidad de transferir un grupo fosfato a sus sustratos y a la vez ser fosforilada por otras quinasas en residuos conservados serina y treonina. En mamíferos existen tres homólogos denominados: AKT1, AKT2 y AKT3, las cuales son activadas gracias a diversas señales extracelulares como factores de crecimiento, hormonas y elementos de la matriz extracelular, sin embargo, no se conoce muy bien cómo se dan los pasos iniciales de activación, pero se sabe que esta se da aguas abajo de las vías de señalización de las fosfatidil inositol 3 quinasas (PI3Ks) [21], Figura 1.

A partir de fosfatidil inositol-difosfato las PI3Ks producen fosfatidil inositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3), el cual es un importante segundo mensajero que es reconocido por la AKT como una señal para migrar del citoplasma a la membrana celular, donde es luego fosforilada por quinasas como las fosfoinositol dependientes tipo 1 (PDK1) y 2 (PDK2) además de otras quinasas que aún no han sido caracterizadas

[21, 22]. Una vez activada, AKT fosforila y regula la función de otras proteínas que tienen funciones relacionadas con el metabolismo celular, la apoptosis y la proliferación celular; en ese sentido se ha asociado en diversos estudios que la activación constitutiva de esta proteína en algunas líneas celulares se relaciona con la presencia de cáncer [21]. El efecto de la activación constitutiva de AKT se ha descrito como un fenómeno derivado de la amplificación de genes y la mutación de algunas de las proteínas involucradas en la vía de señalización y activación de la AKT, así como la mutación y alteración de algunos de los sitios de fosforilación de esta proteína que por lo general se encuentran disponibles a la adición de grupos fosfato bajo regulaciones específicas. La activación constitutiva conlleva a la proliferación y supervivencia descontrolada, lo cual puede contribuir a la generación y progresión de algunos tipos de cáncer, dado que las células cancerígenas adquieren diversos fenotipos que les permiten sobrevivir mejor en ambientes hostiles [21, 22], Figura 2.

En la Figura 2 se puede ver: A. Ruta de activación de AKT. Luego de una señal externa (generalmente de estrés), la célula activa AKT con el objetivo de promover una respuesta, la activación biológica de AKT depende de su migración del citoplasma de la célula a la membrana, en donde su dominio PH reconoce al PI3P. Este reconocimiento desencadena el cambio estructural de la proteína que deja expuestos los residuos serina y treonina para que otras quinasas los fosforilen promoviendo la activación de AKT. En el contexto de cáncer, la mutación de algunos aminoácidos del dominio PH promueve la activación constitutiva de AKT en ausencia de señal o reconocimiento de segundos mensajeros como PI3P, debido a que sus residuos de serina y treonina están siempre disponibles. La activación de AKT conlleva al desarrollo de procesos de supervivencia celular y en el caso de cáncer, de crecimiento y supervivencia descontrolados. B. Respuestas celulares derivadas de la activación de AKT. Una vez activada, AKT puede fosforilar a otras quinasas promoviendo su activación o represión. En muchos casos, la activación de AKT conlleva a la represión de factores que promueven la apoptosis y por otro lado la activación de factores que conllevan a la inhibición directa o indirecta de la muerte celular programada.

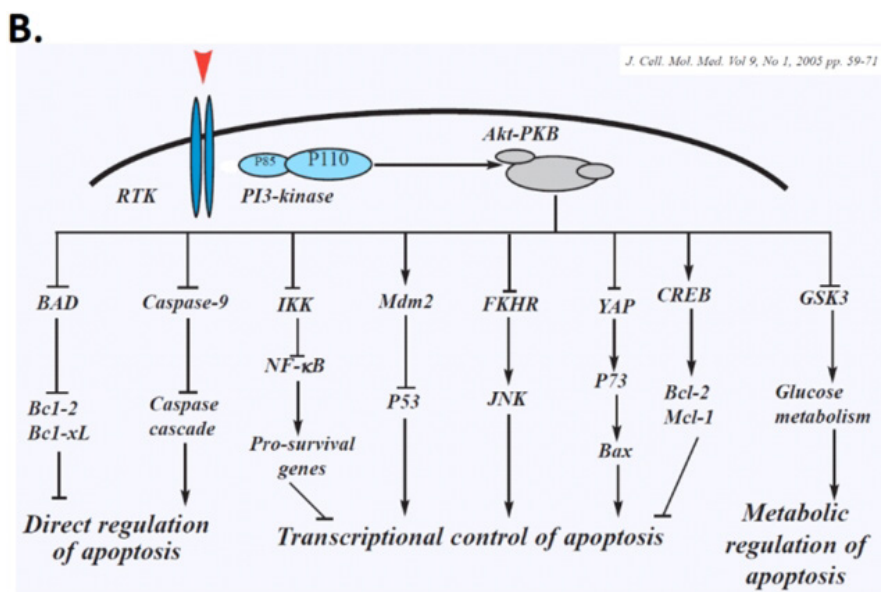
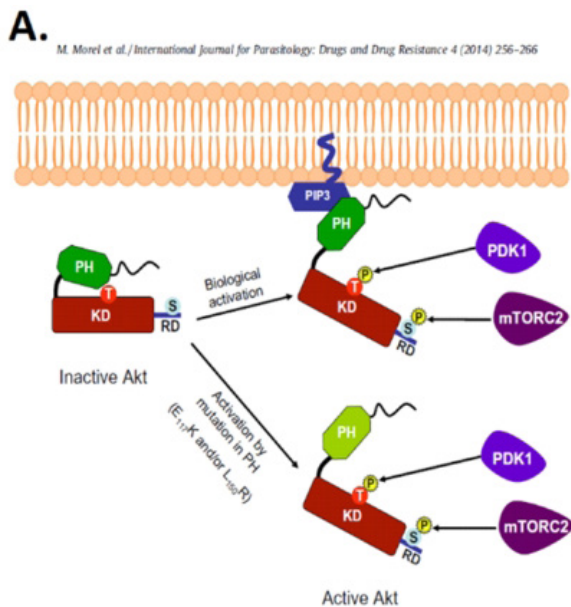


Figura 2. Modelo propuesto para la activación de la AKT de mamíferos en el contexto del cáncer.

Fuente: Tomado y modificado de [21, 22].

Como se mencionó anteriormente, AKT participa como un regulador maestro de diferentes rutas metabólicas y su descubrimiento comenzó con la caracterización del oncogén viral: V-akt, el cual generaba ciertos tipos de leucemia en ratones. La búsqueda de este gen dentro del genoma de humanos, llevó al reconocimiento de V- akt como una quinasa relacionada con las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC), por lo cual se denominó proteína quinasa B. Con el tiempo, se renombró esta proteína solo como AKT y se descubrió que en humanos existen tres variantes con una identidad aminoacídica mayor al 80% denominadas PKB α (AKT1) PKB β (AKT2) y PKB γ (AKT3) [23].

Las características estructurales de las quinasas AKT son la presencia de tres dominios conservados: Un dominio de homología *plekstrin* (PH) el cual se encuentra en la región N terminal de aproximadamente 100 aminoácidos, este dominio se ha asociado por comparación con otras quinasas y por análisis de inhibición *in vitro* con la capacidad de unión al PI3P. Adyacente al dominio PH, se encuentra el dominio denominado catalítico, el cual posee un alto grado de identidad con el que poseen tanto la PKA como la PKC. En este dominio se encuentra un aminoácido conservado (una treonina en la posición 308 de la AKT de humanos) cuya fosforilación se ha descrito por ser necesaria para la activación de la PKB/AKT. Finalmente, dentro de la región hidrofóbica de la cola C terminal se ha descrito un dominio denominado regulador, el cual contiene un segundo aminoácido conservado (una serina en la posición 473 de la AKT de humanos) que también está relacionado con la fosforilación como paso necesario para la activación de la PKB/AKT [3, 21-23]. Figura 3.

Oncogene (2005) 24, 7493-7501
© 2005 Nature Publishing Group All rights reserved 0950-9232/05
www.nature.com/onc

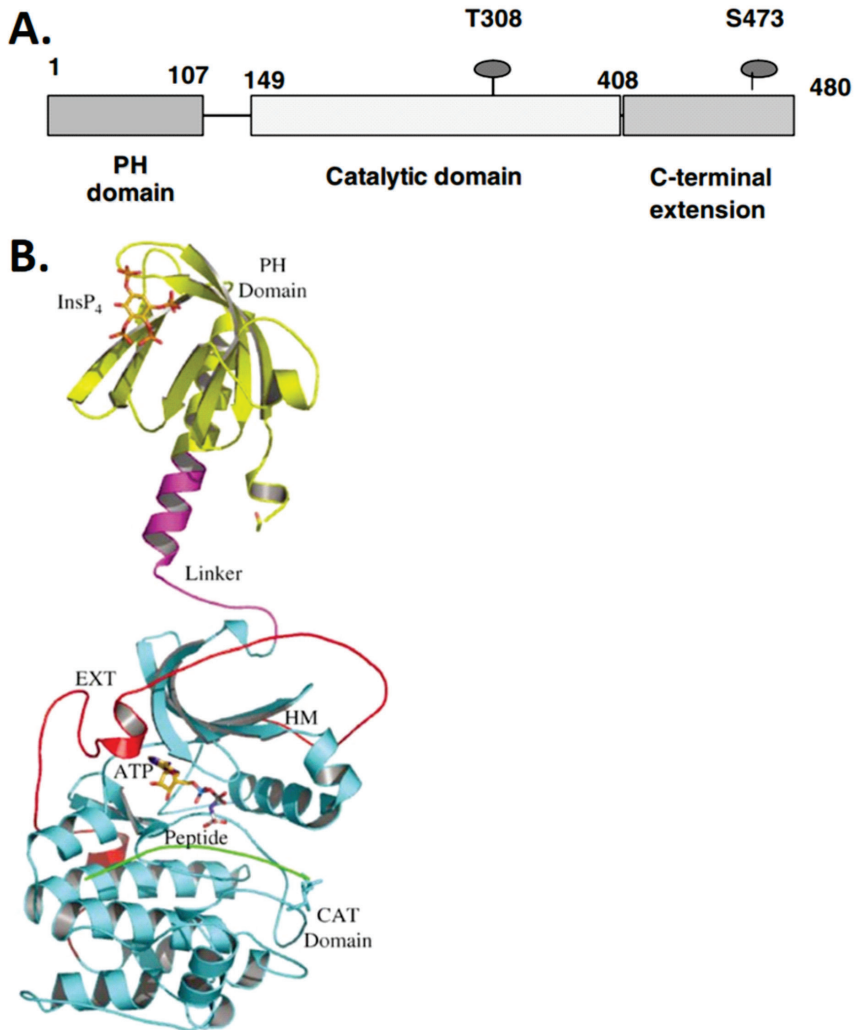


Figura 3. Características estructurales descritas para la proteína AKT de humanos.

Fuente: Tomado y modificado de [3].

En la Figura 3 se puede ver: A. Resumen de los dominios estructurales de la secuencia de aminoácidos de la AKT 1. Se puede observar la presencia del dominio de homología pleckstrin (PH), que se une a segundos mensajeros como PI3F, un dominio catalítico o (CAT) que

posee un motivo de unión a ATP y un dominio de regulación en el extremo C terminal denominado (EXT). Adicionalmente se muestran los residuos conservados de treonina y serina en las posiciones 308 y 473 respectivamente, los cuales son fosforilados por otras quinasas promoviendo la activación de AKT. B. Composición de la estructura cristalográfica de la proteína AKT1 de humanos. La proteína AKT1 se muestra exponiendo los tres dominios principales y sus características estructurales al estar unida al fosfatidil inositol 4 fosfato (InsP4) y al ATP. También se muestra un motivo hidrofóbico presente en el dominio de extensión de la región C terminal y el denominado linker (LINK), que es la región que conecta al dominio PH con el dominio CAT, el cual funciona como bisagra y es altamente divergente entre las proteínas AKT. Tomado y modificado de [3]. La fosforilación de la serina en la posición 473 de PKB/AKT, depende del estímulo de factores de crecimiento y otras señales extracelulares que terminan con la activación de ésta. Otros residuos de serina y treonina en posiciones distintas han sido descritos por estar disponibles para ser fosforilados, sin embargo, no se ha encontrado ningún tipo de activación de la PKB/AKT luego de la fosforilación de éstos [3, 21-23].

Como se mencionó anteriormente, AKT se activa gracias a los pasos subsecuentes derivados de las vías de señalización de las PI3Ks que promueven el aumento de PI3P, y no se han descrito otros mecanismos de activación independientes del sistema de las PI3Ks. Muchas de las señales que desencadenan la activación de las PI3Ks promueven el reclutamiento de AKT a la membrana, evento que depende de las señales generadas por los receptores tipo tirosina quinasa acopladas a proteínas G. Adicionalmente se ha descrito la existencia de proteínas como la fosfatasa PTEN, la cual tiene la capacidad de remover grupos fosfato de los PI3P y en consecuencia regula negativamente el reclutamiento y posterior activación de AKT en la membrana celular. Cuando AKT migra a la membrana, no es activada por la unión de PI3P, sino que la unión en sí genera un cambio conformacional en AKT que expone sus residuos serina y treonina para ser fosforilados por otras quinasas como la PDK1 [23].

PDK1 tiene también un dominio PH, el cual se une a las regiones lipídicas que son ricas en PI3P, promoviendo su colocalización con la quinasa AKT. Este acercamiento permite que PDK1 fosforile el residuo de treonina de la posición 308 promoviendo que AKT sea activada; sin embargo, se ha descrito que para que AKT esté totalmente activada ésta debe ser fosforilada no solo en el residuo de treonina de la posición 308, sino que debe existir una segunda fosforilación en la serina 473 del dominio regulador. No se ha atribuido aun cual es el mecanismo por el cual se da la fosforilación de este segundo residuo, sin embargo, se ha involucrado a la PDK2 como el posible encargado de realizar dicha acción [23].

Adicionalmente, se conoce que las dos fosforilaciones ocurren de forma secuencial e independiente, mas no de forma simultánea, mostrando que el patrón de fosforilaciones de AKT podría tener un significado biológico importante que complejiza el conocimiento de que la sola fosforilación de ésta desencadena una señal, sino que dicha señal puede ser distinta de acuerdo al estatus de fosforilación de la misma. Otra de las características estructurales interesantes de AKT es la presencia de dos tirosinas situadas en el dominio catalítico en las posiciones 315 y 326. Las cuales se han asociado con procesos de fosforilación que desencadenan la desactivación de AKT. En ese sentido se puede decir que el estatus de activación de AKT depende de señales de encendido, generadas por la disponibilidad de PI3P y de apagado, generadas por la acción con fosfatases que actúan sobre la AKT y que aún no se han descrito [3, 21-23].

Algunas líneas celulares que son modelo de cáncer y muestras derivadas de tumores extraídos de pacientes, han mostrado que AKT se comporta como un oncogén cuyo número de copias ha sufrido una amplificación. Este hecho desencadena la producción de una concentración más alta de AKT que promueve procesos de supervivencia celular descontrolados. A pesar de que no se ha asociado directamente la amplificación genética del gen que codifica para AKT como el factor único que desencadena la supervivencia exacerbada de las líneas celulares cancerígenas, se ha llegado a la conclusión que un aumento causado por cualquier factor en la concentración de la AKT, promueve la aparición de algún tipo de cáncer [21].

Otro factor que está relacionado con el aumento de AKT y por ende con la aparición de cáncer, es la desregulación de proteínas PI3Ks, las cuales podrían contribuir a la sobre activación de AKT sin la necesidad que se encuentre sobre expresada. Adicionalmente, la expresión aumentada de receptores de membrana que conllevan a la señalización y subsecuente activación de AKT, también ha mostrado ser un factor presente en muchos tipos de cáncer, donde la proliferación y la supervivencia celular se ve aumentada posiblemente gracias al aumento del reclutamiento y activación de AKT. La pérdida de supresores de la producción de PI3P también se ha involucrado con la adquisición de cáncer, dado el hecho de que la activación de AKT está sobrerregulada debido al exceso de señal generada por el PI3P disponible en la membrana celular [21].

Los procesos celulares regulados por AKT, dependen de los sustratos que esta proteína fosforila. Diversos estudios han logrado determinar que AKT fosforila sustratos que poseen el dominio conservado de aminoácidos: Arg-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-[ser/thr]-Hyb, donde Xaa es cualquier aminoácido y Hyb es un aminoácido altamente hidrofóbico. Este motivo de reconocimiento ha sido encontrado en un gran número de proteínas que desempeñan un papel en diversas y numerosas funciones. Es interesante anotar que muchos de los blancos descritos para AKT en células humanas tienen localización nuclear y en consecuencia se han asociado con la localización dual de AKT que luego de ser activada migra al núcleo celular para ejercer su función [3, 21-23].

Algunas de las funciones atribuidas a la quinasa AKT, son directamente relacionadas con las funciones descritas para sus blancos, dentro de las que se destacan la promoción de la supervivencia celular y mecanismos anti-apoptóticos. Así se ha llegado a la conclusión que la baja regulación de AKT en líneas celulares humanas desencadena el aumento de los eventos de iniciación de apoptosis, mientras que el aumento en la expresión promueve el aumento de los eventos de sobrevivencia y proliferación celular [21] (Figuras 1 y 2).

Los mecanismos por los cuales AKT promueve la supervivencia celular en humanos, se han descrito como el resultado de la intervención de múltiples vías de señalización, por ejemplo mediante la disminución de los transcritos que codifican para factores que inducen la muerte

celular mediante la fosforilación de reguladores transcripcionales como FKHR, el cual promueve el secuestro de proteínas citoplasmáticas que se comportan como potenciadores de la transcripción de genes involucrados con la apoptosis(Figura 2). Otro mecanismo descrito es la promoción del aumento en los transcritos que codifican para genes de supervivencia por activación de los factores de transcripción NF- κ B y CREB. Adicionalmente la fosforilación y subsecuente inactivación de proteínas proapoptóticas como BAD y el mantenimiento de la integridad mitocondrial por medio de la activación de hexoquinas se han asociado con el aumento de fenómenos de sobrevivencia en las células donde AKT está constitutivamente activada [23].

También se ha descrito que la expresión aumenta de AKT en líneas celulares humanas promueve la progresión del ciclo celular, dándole a la AKT un papel relevante en dicho fenómeno. Otros estudios han mostrado que AKT está relacionada con los integrantes de los complejos mTORc en humanos, específicamente con las quinasas conocidas como mTOR/FRAP, las cuales se han caracterizado como protagonistas del control de la regulación de la síntesis de proteínas bajo el estímulo de señales extracelulares [23].

Por lo anterior y debido en gran medida a la generación de actividad antiapoptótica, a la producción desregulada de factores de crecimiento y la regulación de la síntesis de proteínas, AKT se ha relacionado en cáncer con procesos por los cuales el tejido tumoral tiene la capacidad de resistir a eventos de hipoxia, deficiencia de nutrientes y de forma extraordinaria, se ha relacionado con procesos de angiogénesis en los cuales se promueve la creación de nuevos vasos sanguíneos que se encargan de llevar oxígeno y nutrientes al tejido tumoral que está en constante crecimiento y sufre de la carencia de estos elementos y del daño por estrés oxidativo [23]. También se ha relacionado la desregulación de AKT con un comportamiento dual del sistema de mantenimiento de telómeros en tejidos tumorales, en donde se ha encontrado que algunas de las enzimas encargadas del mantenimiento de la longitud de los telómeros poseen motivos de fosforilación de AKT por lo cual la desregulación de ésta promueve la inmortalización de algunas líneas celulares debido a la prolongación de la vida media del material genético de algunas células. Por el contrario, otros estudios han encontrado que

AKT disminuye la capacidad de mantener la longitud de los telómeros, aumentando la tasa de mutaciones en otros genes que pueden tener roles en procesos de tumorigénesis y desarrollo de cáncer [23].

En resumen, la quinasa AKT es una proteína maestra que conecta múltiples vías de señalización y desencadena respuestas celulares variables que promueven la supervivencia celular. La relación entre la desregulación de AKT y la presencia de eventos carcinogénicos, ha llevado a proponer a la quinasa AKT como un buen blanco terapéutico para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. En ese sentido, como la desregulación de AKT promueve la supervivencia celular y en consecuencia el desarrollo de algunos tipos de cáncer, el diseño de un inhibidor específico contra esta proteína, combinado con los tratamientos actuales utilizados para disminuir el desarrollo de cáncer, podría contribuir a la creación de tratamientos más efectivos para combatir dicha enfermedad.

Del cáncer a las parasitosis

Como se mencionó, las quinasas son proteínas conservadas a lo largo de la evolución de la mayoría de organismos eucariotas. A estas proteínas se les han atribuido roles protagonistas en diferentes procesos relacionados con el control de la proliferación celular, la diferenciación y el metabolismo. Dado lo anterior, en la actualidad se ha accedido al diseño de inhibidores específicos de la actividad de estas quinasas como alternativa terapéutica contra algunas enfermedades dentro de las que se destaca cáncer [23].

Es reconocido que la conservación evolutiva de las quinasas presentes en diferentes organismos, que incluyen algunos agentes etiológicos, podría convertirse en una ventaja para el desarrollo y la búsqueda de nuevos fármacos y sustancias tóxicas que han sido usadas para en el tratamiento de cáncer, haciendo a las quinasas buenos blancos terapéuticos [21, 22].

Un ejemplo interesante del uso de inhibidores de quinasas diseñados para el tratamiento de algunos tipos de cáncer en patologías distintas como las parasitosis, es el evidenciado en el modelo propuesto para el parásito *Schistosoma mansoni*, agente etiológico de la esquistosomiasis, en donde el uso de una librería de inhibidores de quinasas sobre estos

parásitos y la evaluación de algunas características biológicas de los mismos como la producción y la postura de huevos, así como la toxicidad en los estadios larvales y adultos, junto con la tasa de inhibición del apareamiento, sirvieron para encontrar nuevos fármacos de segundo uso para el control de dicha enfermedad [22].

Gracias a esta estrategia se logró generar un alto impacto sobre la fisiología y la tasa reproductiva de estos parásitos, confirmando la importancia de las quinasas en la biología de los mismos y el efecto deletéreo producido por el uso de estas proteínas como blanco terapéutico. En este estudio se confirmó particularmente que la AKT de *Schistosoma mansoni*, es un buen blanco dados los efectos tóxicos generados sobre el parásito al usar un inhibidor específico contra esta proteína, lo cual es atribuido al hecho mencionado anteriormente en el que se destaca a la AKT como una proteína protagonista en la transducción de múltiples señales dirigidas a la activación y/o represión de diferentes procesos celulares, dentro de los que se destaca la supervivencia celular, el metabolismo energético y la síntesis de proteínas. Se concluyó que la AKT de *Schistosoma mansoni*, es una quinasa altamente conservada con respecto a otros eucariotas y que su actividad puede ser inhibida mediante el uso de medicamentos que actualmente se encuentran disponibles en el mercado [21, 22].

Algunas de las denominadas enfermedades olvidadas son causadas por tripanosomátidos como *T. cruzi*, *T. brucei* y diversas especies de *Leishmania* spp. las cuales generan una amplia gama de patologías que van desde la miocardiopatía chagásica causada por *T. cruzi*, la enfermedad del sueño africana causada por *T. brucei*, hasta las denominadas leishmaniasis cuyas manifestaciones clínicas son diversas. El arsenal terapéutico con el cual se combate a estos agentes etiológicos es limitado e insatisfactorio, además sus compuestos suelen ser tóxicos y generar efectos secundarios adversos para los pacientes que los usan. Adicionalmente el aumento progresivo de incidencia de poblaciones de parásitos resistentes a dichos compuestos, es un fenómeno común que ha tomado fuerza en los últimos años. En ese sentido existe la urgente necesidad del desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas [9, 17].

Otro ejemplo del uso de medicamentos utilizados para combatir patologías como el cáncer en otro tipo de enfermedades parasitarias

como la leishmaniasis, es el evidenciado con el modelo de los lisofosfolípidos alquílicos o ALPs por sus siglas en inglés, que fueron propuestos como prometedores agentes terapéuticos de segundo uso. Los ALPs constituyen una familia de compuestos con potencial antiparasítico dentro de los cuales se encuentra la edelfosina, uno de los medicamentos con alto potencial para el tratamiento oral de la leishmaniasis visceral y cutánea [24].

Es interesante ver cómo, los ALPs han sido ampliamente asociados en investigaciones de desarrollo de medicamento contra cáncer, como agentes inhibidores de las respuestas de sobrevivencia, es decir, potenciadores de procesos apoptóticos en las líneas celulares tumorales evaluadas y en modelos tanto *in vitro*, como *in vivo*. Estos hallazgos apuntan a la inhibición directa o indirecta de la quinasa AKT, reafirmando la conclusión de que esta proteína se comporta como un buen blanco terapéutico no solo para el tratamiento del cáncer, sino de las parasitosis generadas por tripanosomátidos y el uso de medicamentos avalados comercialmente para inhibir dicha proteína podría convertirse en una buena estrategia para mitigar los problemas asociados a la infección con dichos organismos [25].

La técnica del RNA de interferencia o iRNA, una herramienta para el análisis funcional de genes en tripanosomátidos

Con el advenimiento de los datos de secuenciación de los diferentes genomas de tripanosomátidos, se creó la necesidad del desarrollo de nuevas estrategias para la caracterización funcional de los diferentes elementos génicos que codifican para un gran número de proteínas con función desconocida o putativa [26, 27]. En ese sentido, una herramienta de alto rendimiento para el estudio y caracterización de la función de genes, ha sido el denominado método de RNA de interferencia (iRNA), el cual está basado en el silenciamiento de genes como consecuencia de la degradación de RNA de doble cadena en RNAs de doble cadena cortos, los cuales activan complejos de ribonucleasas que son dirigidos para reconocer un mRNA homólogo causando el *knock down* del gen de interés. Este método es actualmente el preferido para la caracterización por pérdida de función en el modelo de *T. brucei* [28, 29].

El fundamento de esta técnica en el modelo de *T. brucei*, radica en la generación de un RNA de cadena doble, que es usado posteriormente como guía por la maquinaria de RNA de interferencia de *T. brucei* para degradar un mRNA blanco. La generación de este RNA pequeño de cadena doble denominado iRNA, se da mediante la clonación de un fragmento de DNA complementario a la secuencia del gen blanco de longitud de entre 400 y 600 pb en un vector de expresión cuyo sitio de múltiple clonado se encuentra situado entre dos promotores T7 opuestos regulados por operadores Tet inducibles por tetraciclina [30, 31], ver Figura 4.

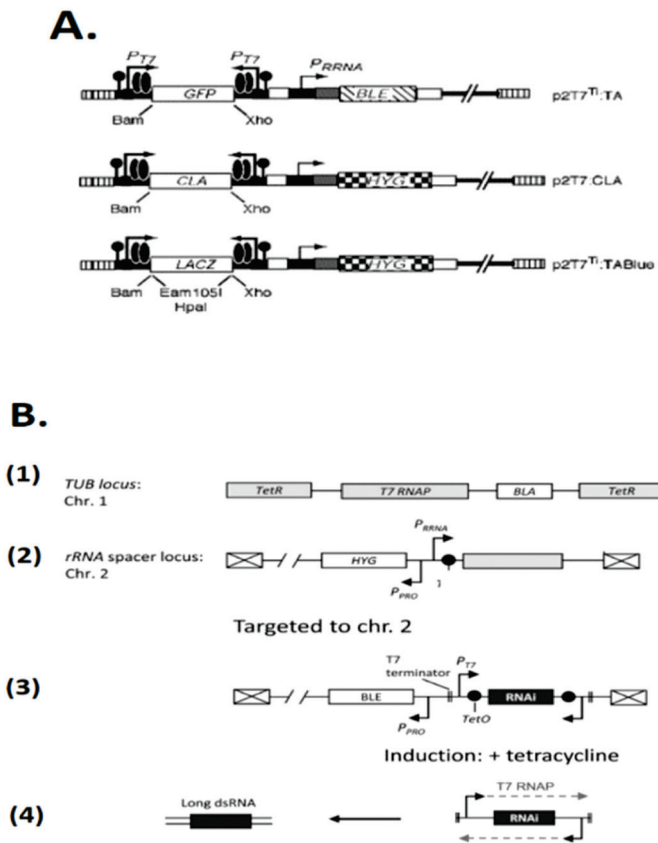


Figura 4. Sistema clásico de i RNA en el modelo de *Tripanosoma brucei*. Fuente: Tomado y modificado de [28-30]

En la Figura 4 se puede ver: A. Vectores P2t7: Constructos diseñados para la generación de un iRNA bajo el control de dos promotores T7 opuestos inducibles por tetraciclina adyacentes a dos secuencias terminadoras. Cada vector tiene un marcador de resistencia que puede ser BLE: gen de resistencia a la bleomicina o HYG: gen de resistencia a la higromicina, los cuales son inducidos por la presencia del promotor del r RNA (región aguas arriba del RNA ribosomal). En este caso, cada constructo fue diseñado para generar un iRNA contra tres genes reporteros distintos: La proteína verde fluorescente o GFP, el gen de la clatrina o CLA y el gen de la β -galactosidasa o LACZ. B. Características genéticas generales de una cepa de *T. brucei* (en este caso la cepa *Sc*) para la generación de interferencia por medio del sistema de iRNA. [1] La cepa *Sc* expresa la RNA polimerasa II del fago T7 el gen represor de Tet gracias a la integración de un constructo en el locus de la tubulina del cromosoma 1. El represor Tet (TetR) es quien se une al operador Tet (TetO) que solo se elimina cuando hay presencia de tetraciclina. [2] Se muestra la “pista de aterrizaje” posicionada en la región intergénica del rRNA del cromosoma 2 en donde el plásmido linealizado del iRNA debe integrarse luego de la transfección. [3] Luego de la transfección, la integración del constructo del iRNA en la pista de aterrizaje genera un sistema inducible de RNAs de doble cadena que serán usados por la maquinaria celular de interferencia. [4] Luego de la inducción con tetraciclina, se genera un fragmento de RNA de cadena doble que es usado por la maquinaria de interferencia del parásito para romper su gen blanco.

El estudio de la función de muchos genes en tripanosomátidos, ha sido facilitado por el uso de la técnica de iRNA; sin embargo, estos análisis han sido llevados a cabo por extrapolación de los resultados encontrados en el modelo de *Trypanosoma brucei*, debido a que tanto *T. cruzi*, como la mayoría de parásitos del género de *Leishmania* han perdido la maquinaria proteica con la cual se genera naturalmente el proceso de iRNA. A pesar de lo anterior, se ha generalizado el uso del modelo de *T. brucei* para el desarrollo de procedimientos de interferencia cuyos resultados son comparables al resto de tripanosomátidos, sin embargo, se ha encontrado en estudios recientes que algunos parásitos del sub genero *viannia* de *Leishmania*, podrían conservar la maquinaria de interferencia, ampliando la posibilidad de realizar esta técnica de

caracterización por supresión de función en un modelo diferente al de *T. brucei* [30, 33].

A pesar de la posibilidad de realizar experimentos de iRNA en tripanosomátidos diferentes a *T. brucei*, se prefiere realizar dicho procedimiento en este modelo debido al amplio desarrollo realizado en el refinamiento y accesibilidad de la técnica en estos parásitos. Este modelo se ha desarrollado a tal punto que se conocen los sitios específicos de integración genómica de los plásmidos de expresión del iRNA en los cromosomas de estos parásitos, siendo las regiones intergénicas del conjunto de genes del RNA ribosomal (rRNA), el locus de mayor preferencia. Este sitio en particular es seleccionado por tener una posición “silenciosa”, es decir, libre de la influencia de posibles secuencias promotoras que puedan acarrear expresiones inespecíficas constitutivas del iRNA [30], Figura 4 (parte B)

En general existen dos estrategias para producir un RNA pequeño de doble cadena o iRNA a través de la expresión generada por un plásmido inducible. La primera opción, es el uso de un plásmido que genera un RNA de doble cadena mediante la clonación de un molde único que es flanqueado por dos promotores T7 opuestos. Esta estrategia ha mostrado tener ventajas frente a otras debido a que solo se requiere de un paso de clonación del ADN blanco. Sin embargo, una de las desventajas derivadas del uso de este sistema, es la expresión constitutiva de iRNA libre de inducción, por lo cual se refinó el mecanismo adicionando un sistema de represión doble que implica la producción del iRNA de doble cadena solo cuando se adiciona tetraciclina al medio, dada la presencia de represores adyacentes a los promotores T7 opuestos [30-32], Ver figura 4 (parte B).

La segunda estrategia, está basada en la clonación aguas abajo de un único promotor, de dos copias de la secuencia de DNA específica en orientaciones opuestas y separadas por un fragmento de DNA denominado “stuffer”. La inducción de la transcripción de un fragmento en el siguiente orden: (blanco)-(stuffer)-(secuencia reversa del blanco), genera un stem-loop de RNA, el cual media la interferencia del blanco [30-32]. Ver Figura 5.

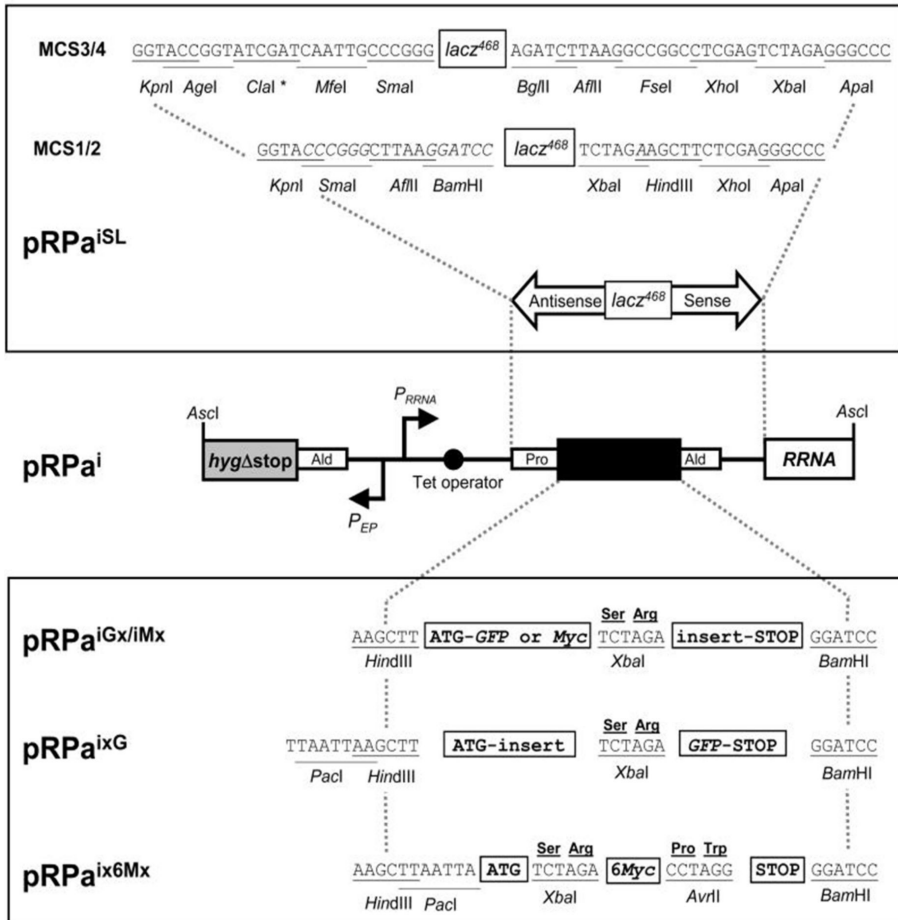


Figura 5. Plásmido pRPai
Fuente: Tomado de [33].

El esquema representativo del plásmido pRPai, Figura 5, el cual cuenta con un sitio de restricción para la enzima AsclI, que permite la linealización del mismo, adicionalmente tiene un fragmento del gen marcador de resistencia (Específicamente la región 3' que promueve resistencia a higromicina al integrarse al locus adecuado). La expresión del pRPai está dada bajo el control del promotor del rRNA y es restringida por el operador inducible por tetraciclina. Aguas arriba del promotor se encuentra la secuencia: (blanco)-(stuffer)-(secuencia reversa del blanco), donde el stuffer es un fragmento de 468 pb flanqueado por dos sitios de múltiple clonado para la inserción de la secuencia blanco

y la secuencia reversa del blanco. Finalmente se muestra la secuencia homóloga al rRNA que permite la integración del plásmido en el locus adecuado.

Existen varios ejemplos de cómo la tecnología del iRNA en el modelo de *T. brucei*, ha servido no solo para estudiar la inusual biología de otros tripanosomátidos a nivel de genes individuales, sino que también, se ha logrado realizar el desarrollo de estrategias de alto rendimiento que permiten, en conjunto con el uso de tecnologías de secuenciación y el uso de librerías que representan las secuencias del genoma completo de este parásito, la caracterización a gran escala de grupos de genes involucrados en procesos particulares como resistencia a medicamentos, metabolismo, virulencia, interacción del parásito con el hospedero, entre otros [31].

La combinación de esta tecnología con métodos de secuenciación masiva, no solo ha logrado promover una visión a escala genómica de genes que participan en procesos particulares, sino que también ha logrado ampliar la caracterización de genes hipotéticos y de función desconocida que empiezan a cobrar importancia en el entendimiento de la regulación del ciclo de vida, mecanismos de control del ciclo celular, respuestas a diferentes estímulos de estrés celular y de forma interesante, se ha logrado ampliar el número de genes candidatos como buenos blancos terapéuticos para futuros usos en el desarrollo de nuevos fármacos. En ese sentido, con esta técnica se ha llegado a entender mejor algunos procesos como la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional, la motilidad flagelar y el metabolismo energético de *T. brucei* [31].

Es interesante anotar, que gracias a estrategias masivas de caracterización de genes que intervienen el fitness de *T. brucei* a través de la tecnología de iRNA, se ha llegado a encontrar que un gran porcentaje de estos está relacionado con funciones de regulación postranscripcional (proteínas cuyos dominios tienen características de unión a RNA) y en gran parte también, se ha encontrado que muchas proteínas quinasas son claves para la supervivencia de estos parásitos, reafirmando la cualidad que las quinasas tienen para comportarse como buenos blancos terapéuticos [31].

Gracias a la técnica de iRNA acoplada a las diferentes modalidades de secuenciación de mRNA se ha llegado a entender no solo cuáles son los blancos genéticos con potencial terapéutico, sino que también ha permitido entender con mayor detalle cuáles son los mecanismos de acción por los que actúan los medicamentos usados para tratar las diferentes enfermedades causadas por tripanosomátidos, además de generar nuevos conocimientos acerca de los mecanismos de resistencia empleados por estos parásitos para tolerar la exposición a dichos fármacos [32].

Otro ejemplo de cómo la metodología de caracterización funcional de alto rendimiento por iRNA en el modelo de *T. brucei*, ha logrado confirmar la existencia de genes que codifican para proteínas encargadas de procesos de recambio de agentes tóxicos y del metabolismo de activación de los mismos, fue el reportado en el 2010 en donde se confirmó que la nitrorreductasa tipo 1 (NTR1) y el transportador de aminoácidos (AAT6), eran proteínas clave para los procesos tanto de activación como de detoxificación de los fármacos nifurtimox, benznidazol y eflornitina respectivamente en el modelo de *T. brucei* [31]. Estos estudios no solo amplían el entendimiento de los mecanismos de acción y resistencia a fármacos en estos parásitos, sino que además reafirman y dan validez a previos estudios que postulaban estos genes como los posibles implicados en la generación de resistencia a dichos fármacos y en el metabolismo de los mismos, confirmando su posible uso como buenos blancos terapéuticos.

Un caso similar del uso de la tecnología de caracterización funcional por iRNA en tripanosomátidos, fue el descrito en el 2010 para entender cómo estaba relacionado el control del ciclo celular en parásitos africanos con la compleja regulación que debe darse para mantener la estabilidad del ciclo de vida en los mismos. Este estudio permitió la caracterización del quinoma completo de *T. brucei* mediante la construcción de una librería de interferencia diseñada para generar el *knockdown* de 190 quinasas predichas mediante análisis bioinformáticos. Se reveló que más de 42 quinasas eran requeridas para la proliferación normal de las formas sanguíneas de estos parásitos en cultivo. Otras 24 quinasas fueron encontradas como reguladoras maestras del ciclo celular afectándolo en la transición G1/S, también se vio afectada la segregación y replicación del kinetoplasto, la mitosis y la citoquinesis. Otras 15 quinasas

fueron encontradas como nuevos reguladores no reportados del ciclo celular y algunas quinasas esenciales para la viabilidad del parásito se propusieron como prometedores blancos para el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias quimioterapéuticas. Es interesante agregar que algunas de las quinasas relacionadas con las vías de señalización de AKT, como PDK1 y algunos integrantes de los complejos Mtorc1 y Mtorc2 fueron encontradas como proteínas que al estar ausentes causan una significativa pérdida de fitness, lo cual sugiere que estas quinasas son posibles buenos blancos terapéuticos [35].

Hasta la fecha, la revolucionaria técnica de edición genómica denominada CRISPR/Cas9, ha sido refinada y mejorada en tal proporción que es posible la elaboración fácil y rápida de procesos de *knockout/knockin* en un modelo de interés, a tal punto que la técnica de iRNA ha sido desplazada y sub utilizada; sin embargo, se ha propuesto el uso de la técnica de iRNA sobre la de CRISPR/Cas9 en los casos en los que se desea investigar la función de genes que pueden tener carácter de esencialidad, es decir, genes que al desaparecer por completo en la célula modelo, ésta morirá dada la importante función de la cual se encarga esta proteína. Los genes que codifican para proteínas esenciales son considerados como los mejores blancos terapéuticos con los cuales se puede proponer el diseño de nuevos fármacos o estrategias quimioterapéuticas y de vacunación. En ese sentido, la técnica de iRNA es una metodología adecuada para la caracterización de genes esenciales dado que ésta permite la disminución gradual de la concentración de transcritos que codifican para la proteína de interés luego del aumento en la concentración del agente inductor de la expresión del iRNA que en general es tetraciclina [36].

En el 2018 se publicó otro estudio en el que se utiliza la tecnología de iRNA acoplada a técnicas de secuenciación de alto rendimiento en el modelo de *T. brucei*, con el objetivo de encontrar quinasas encargadas de la respuesta al estrés requerida para la supervivencia de los parásitos en el hospedero mamífero. Se encontraron 49 quinasas que generaron una significativa pérdida de fitness del parásito en el hospedero, dentro de las que se destacan algunas con funciones putativas dentro de la vía de señalización de las PI3K/mTOR de las cuales se especula que actúan promoviendo la supervivencia del parásito en condiciones de estrés

celular. Este hecho reafirma, como se mencionó anteriormente, que esta herramienta permite el análisis de la función y el descubrimiento de proteínas blanco con potencial terapéutico [37].

En el 2013, el laboratorio de investigación del doctor Sam Alford refinó la técnica de iRNA en *T. brucei*, eliminando la variabilidad experimental y defectos en la reproducibilidad que son generados por la expresión diferencial del iRNA debido a factores epigenéticos y dependientes de las zonas flanqueantes en las cuales se inserta el vector de interferencia dentro del genoma de estos parásitos [34].

Las estrategias utilizadas para disminuir los problemas mencionados, consistieron en la elaboración de una serie de constructos para la expresión ectópica de proteínas recombinantes marcadas con genes reporteros o etiquetas y para la expresión de iRNA mediante el sistema “[blanco] - [Stuffer] - [secuencia reversa del blanco]” mencionada anteriormente; ver figuras 4 y 5. Estos constructos contienen elementos reguladores Tet-on, que inducen la expresión de los transcritos de interés mediante la adición de tetraciclina al medio en el que se encuentran los parásitos. Adicionalmente, esta batería de plásmidos cuenta con sitios promotores T7, que son activados únicamente cuando la RNA polimerasa T7 está presente. La anterior característica, plantea la necesidad de una línea celular de parásitos que expresen dicha polimerasa, por lo cual, los investigadores incorporan a este modelo de iRNA una segunda característica, y es el uso de una cepa modificada para expresar la RNA polT7 junto con la proteína de unión al represor Tet-on. Como se puede observar, todas las modificaciones planteadas para el sistema tienen la intención de eliminar expresiones inespecíficas del iRNA cuando los parásitos no están sometidos a la inducción por tetraciclina y en general cuando la RNA pol II del fago T7 no está ejerciendo su actividad de transcripción sobre el constructo [34].

En general, se ha descrito que las modificaciones genéticas más estables y de mejores características, son las que se basan en sistemas de expresión con plásmidos integrados por recombinación homóloga en el genoma de los parásitos. La expresión basada en plásmidos episomales suele perderse con el tiempo y a lo largo de los años ha entrado en desuso. En ese sentido, la mayoría de vectores integrativos usados

para transfectar *T. brucei* han sido diseñados para que se integren en las regiones intergénicas del gen del rRNA, que es uno de los blancos preferidos por los investigadores, sin embargo, existen reportados nueve loci correspondientes a estas regiones intergénicas a lo largo de diferentes cromosomas, por lo cual se genera la desventaja de no controlar en cuál y cuántos de estos loci se integra el constructo diseñado, lo que promueve variabilidad en la expresión del transcrito de interés y en algunos casos, pueden existir elementos adyacentes a las regiones intergénicas del rRNA que incluso pueden causar silenciamiento del plásmido integrado [34].

Basados en lo anterior, los investigadores del laboratorio del doctor Alford proponen hacer una modificación genética adicional a la cepa de *T. brucei* destinada a la realización de experimentos de iRNA que denominaron 2T1 (VSG221 expressing, Tagged, clone 1), con la incorporación de una “pista de aterrizaje” (Figura 6) que se basa en la integración de un cassette que contiene la secuencia del gen de resistencia a puromicina (PAC) y la mitad de la secuencia del gen de resistencia a higromicina, específicamente la región 3'. Ver figura 4 y 5.

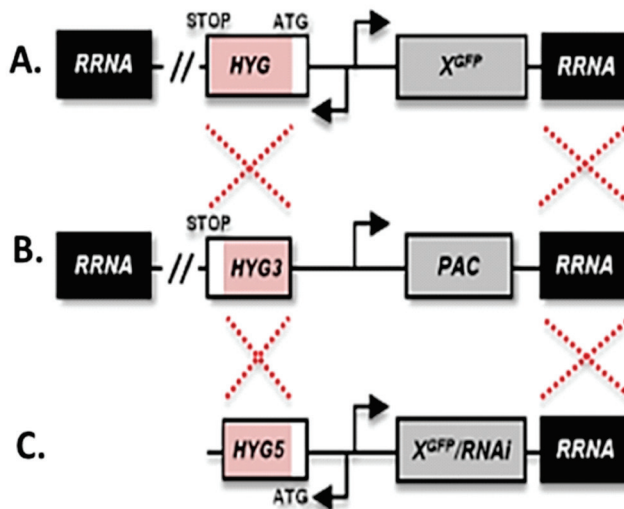


Figura 6. Esquema general de la estrategia de recombinación del plásmido pRPA^{isl} en la pista de aterrizaje.

Fuente: Tomado y modificado de [36].

En la Figura 6 se puede observar: A. Muestra el esquema de un constructo pRPA_{Isl} que se debe integrar en el locus específico de la pista de aterrizaje, en este caso con un reportero de GFP. B. Pista de aterrizaje integrada en la región intergénica del gen que codifica para el rRNA. Se muestra además el gen de resistencia a higromicina incompleto que en el caso de la pista de aterrizaje tiene el fragmento 3' y que debe ser completado por el fragmento 5' presente en los plásmidos pRPA. C. Muestra el esquema de un plásmido típico pRPA que puede tener función tanto de marcaje de proteínas recombinantes, (en este caso con la etiqueta GFP), así como de generación de iRNA.

Dado lo anterior, los parásitos modificados serán resistentes a puromicina y adicionalmente tendrán un locus específico donde se puede integrar cualquier plásmido que contenga las regiones flanqueantes de recombinación adecuadas, que en este caso son las presentes en los genes del rRNA. El constructo para generar la expresión controlada de iRNA entonces se denominó pRPaiSL y como característica adicional, contiene la región 5' faltante del gen de resistencia a hygromicina; ver figuras 5 y 6 [34].

Resumiendo, los investigadores proponen un modelo de línea celular de parásitos de *T. brucei* denominada 2T1 que cuenta con una pista de aterrizaje para el plásmido de expresión de iRNA denominado pRPaiSL, el cual se integrará y genera parásitos resistentes a higromicina y sensibles a puromicina [esto último debido al hecho de que, al integrarse el plásmido en el locus, se reemplaza el gen de resistencia inicial de puromicina por el de higromicina]. Los marcadores de resistencia entonces se convierten en un ventajoso y estricto sistema de selección doble que determina que los parásitos han integrado el constructo en la posición deseada. El plásmido pRPA en general ha sido probado en diversos estudios en combinación con etiquetas de marcado como GFP o cMyc y ha constituido una herramienta no solo para la generación del *knockdown* de genes de interés, sino también para la sobre expresión de proteínas marcadas con el objetivo de determinar su localización y el efecto inherente al aumento en la concentración de la misma sobre un proceso particular [34].

Conclusiones

Las quinasas son enzimas que cumplen diversas funciones sobre el mantenimiento de la homeostasis celular en tripanosomátidos, lo cual las hace ser consideradas buenas candidatas a blancos terapéuticos debido a su posible carácter esencial. La quinasa AKT es un ejemplo de blanco prometedor para el desarrollo de futuros fármacos para el tratamiento de las tripanosomiasis debido a su rol central en el mantenimiento de respuestas a estrés celular mediante la inhibición de la apoptosis y la activación de un gran número de procesos celulares que van desde la síntesis de proteínas hasta la activación del tráfico vesicular. En ese sentido, se hace necesaria la caracterización funcional de las quinasas para validar su función y su posible rol como blanco terapéutico mediante técnicas de edición genética como iRNA para la generación de *knockdown* de los transcritos que codifican para proteínas de interés.

Agradecimientos

A Colciencias, Colombia, por la financiación de proyectos relacionados con esta temática y a la Dirección General de Investigaciones de la Universidad de Santiago de Cali, por la financiación de un proyecto relacionado con las quinasas de la ruta PI3k/AKT/mTOR. Estas investigaciones permitieron el desarrollo de este capítulo.

Referencias

- [1] Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):225-36.
- [2] Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. (0092-8674 (Print)).
- [3] Kumar CC, Madison V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene*. 24. England2005. p. 7493-501.
- [4] Goldsmith EJ, Akella R, Min X, Zhou T, Humphreys JM. Substrate and Docking Interactions in Serine/Threonine Protein Kinases. *Chemical Reviews*. 2007;107(11):5065-81.
- [5] Gross S, Rahal R, Stransky N, Lengauer C, Hoefflich KP. Targeting cancer with kinase inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(5):1780-9.

- [6] MacCorkle RA, Tan TH. Mitogen-activated protein kinases in cell-cycle control. (1085-9195 (Print)).
- [7] Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. 2012;18(3):363-74.
- [8] Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics. 2005;6:127.
- [9] Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. Parasit Vectors. 2017;10(1):287.
- [10] Merritt C, Silva LE, Tanner AL, Stuart K, Pollastri MP. Kinases as druggable targets in trypanosomatid protozoan parasites. Chem Rev. 2014;114(22):11280-304.
- [11] Fernandez-Moya SM, Estevez AM. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2010;1(1):34-46.
- [12] Akinleye A, Avvaru P, Furqan M, Song Y, Liu D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics. J Hematol Oncol. 2013;6(1):88.
- [13] Martinez-Outschoorn UE, Pavlides S, Howell A, Pestell RG, Tanowitz HB, Sotgia F, et al. Stromal-epithelial metabolic coupling in cancer: Integrating autophagy and metabolism in the tumor microenvironment. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2011;43(7):1045-51.
- [14] Klinkert MQ, Heussler V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. Mini Rev Med Chem. 2006;6(2):131-43.
- [15] Bahia D, Oliveira LM, Lima FM, Oliveira P, Silveira JF, Mortara RA, et al. The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*--new tools for designing specific inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 390. United States2009. p. 963-70.
- [16] Bahia D, Oliveira LM, Mortara RA, Ruiz JC. Phosphatidylinositol- and related-kinases: a genome-wide survey of classes and subtypes in the *Schistosoma mansoni* genome for designing subtype-specific inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 380. United States2009. p. 525-30.
- [17] Nussbaum K, Honek J, Cadmus CM, Efferth T. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. Curr Med Chem. 17. Netherlands2010. p. 1594-617.

- [18] Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem.* 275. United States2000. p. 32182-6.
- [19] Barquilla A, Crespo JL, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14579-84.
- [20] Hall BS, Gabernet-Castello C, Voak A, Goulding D, Natesan SK, Field MC. TbVps34, the trypanosome orthologue of Vps34, is required for Golgi complex segregation. *J Biol Chem.* 281. United States2006. p. 27600-12.
- [21] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 14. England2002. p. 381-95.
- [22] Morel M, Vanderstraete M, Cailliau K, Lescuyer A, Lancelot J, Dissous C. Compound library screening identified Akt/PKB kinase pathway inhibitors as potential key molecules for the development of new chemotherapeutics against schistosomiasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014;4(3):256-66.
- [23] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 9. England2005. p. 59-71.
- [24] Varela MR, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Muller I, Modolell M, Munoz DL, et al. In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1612.
- [25] Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs.* 2003;14(2):167-73.
- [26] Jackson AP. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology.* 2015;142 Suppl 1:S40-56.
- [27] Choi J, El-Sayed NM. Functional genomics of trypanosomatids. *Parasite Immunol.* 2012;34(2-3):72-9.
- [28] Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):657-85.
- [29] Alsford S, Glover L, Horn D. Multiplex analysis of RNA interference defects in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;139(1):129-32.
- [30] Alibu VP, Storm L, Haile S, Clayton C, Horn D. A doubly inducible system for RNA interference and rapid RNAi plasmid construction in

- Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 139. Netherlands2005. p. 75-82.
- [31] Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, et al. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. Genome Res. 2011;21(6):915-24.
- [32] Baker N, Alsford S, Horn D. Genome-wide RNAi screens in African trypanosomes identify the nifurtimox activator NTR and the eflornithine transporter AAT6. Mol Biochem Parasitol. 2011;176(1):55-7.
- [33] Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, et al. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. PLoS Pathog. 2010;6(10):e1001161.
- [34] Alsford S, Horn D. Single-locus targeting constructs for reliable regulated RNAi and transgene expression in *Trypanosoma brucei*. (0166-6851 (Print)).
- [35] Jones NG, Thomas EB, Brown E, Dickens NJ, Hammarton TC, Mottram JC. Regulators of *Trypanosoma brucei* Cell Cycle Progression and Differentiation Identified Using a Kinome-Wide RNAi Screen. PLOS Pathogens. 2014;10(1):e1003886.
- [36] Unniyampurath U, Pilankatta R, Krishnan MN. RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAi? Int J Mol Sci. 2016;17(3):291.
- [37] Fernandez-Cortes F, Serafim TD, Wilkes JM, Jones NG, Ritchie R, McCulloch R, et al. RNAi screening identifies *Trypanosoma brucei* stress response protein kinases required for survival in the mouse. Scientific Reports. 2017; 7(1): 6156.