



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

Departamento:

Programa de acreditación:
PROINCE

Programa de Investigación¹: Resolución Rectoral 348/20

Código del Proyecto: E-18

Título del proyecto: Búsqueda de nuevos blancos para la intervención terapéutica de la Enfermedad de Chagas: Rol de la proteína TcSR62 y su capacidad de unión al DNA.

PIDC:

Elija un elemento.

PII:

Elija un elemento.

Director: Levy, Gabriela Vanesa

Director externo:

Codirector:

Integrantes: Aldana Marcos, Hernán Javier
Barcos, Lucia Soledad
Farinati, Anabella Maricel
Nahmias, Mariela.

Investigador Externo, Asesor- Especialista, Graduado UNLaM:

Alumnos de grado: (Aclarar si tiene Beca UNLaM/CIN)

Alumnos de posgrado:

Resolución Rectoral de acreditación: N° 348/20

Fecha de inicio: 01-01-2020

Fecha de finalización: 30-06-2022

¹ Los Programas de Investigación de la UNLaM están acreditados con resolución rectoral, según lo indica la Resolución HCS N° 014/15 sobre **Lineamientos generales para el establecimiento, desarrollo y gestión de Programas de Investigación a desarrollarse en la Universidad Nacional de La Matanza**. Consultar en el departamento académico correspondiente la inscripción del proyecto en un Programa acreditado.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

A. Desarrollo del proyecto (adjuntar el protocolo)

A.1. Grado de ejecución de los objetivos inicialmente planteados, modificaciones o ampliaciones u obstáculos encontrados para su realización (desarrolle en no más de dos (2) páginas)

El presente proyecto tiene 3 objetivos específicos:

- 1. Modelar los dominios dedos de zinc de la proteína TcSR62 para la identificación de pequeñas moléculas orgánicas que permitan su reposicionamiento al tratamiento de la enfermedad de Chagas.** Este objetivo fue modificado y se cumplió totalmente. Debido a resultados previos de nuestro laboratorio que sugirieron la relevancia de los dominios de unión a RNA (dominios RRM) fue que se decidió comenzar el modelado seguido de *docking* molecular en estas regiones de la proteína. Debido a que la proteína TcSR62 de *T. cruzi* presenta una proteína ortóloga en *T. brucei* y ambas de las funciones podrían ser compartidas se amplió este objetivo de manera de poder estudiar la conformación tridimensional de ambas proteínas. De esta manera y como se describió en el informe de avance, se logró no sólo obtener una lista de drogas con propiedades potencialmente inhibitorias de los dominios RRM de la proteína TcSR62 de *T. cruzi* sino que fue extensivo a *T. brucei*. Se obtuvo así una lista de drogas de las cuales pudieron adquirirse 13 de la empresa MERCK (**Figura 1**). Un compuesto fue reclamado y devuelto a la empresa por haber llegado en una fecha cercana a su vencimiento. Las demás drogas fueron evaluadas en cultivos axénicos de *T. cruzi* y aún no se ha comenzado con la evaluación de las eficacias en *T. brucei*.

CAS Number	Compuesto	TbRRM1			TcSR62		
		RRM1	RRM2	RRM3	RRM1	RRM2	RRM3
14919-77-8	Benserazida		x	x	x		
22204-24-6	Pirantel pamoato	x	x		x		x
118288-08-7	Lafutidina			x			
57470-78-7	Celiprolol HCl		x			x	
21679-14-1	Fludarabina			x		x	
33564-30-6	Cefoxitina de sodio					x	
3092-17-9	Midrodrina HCl	x	x	x	x		x
78281-72-8	Nepafenac	x			x	x	x
50264-69-2	Lonidamina	x		x			x
162401-32-3	Roflumilast				x		
475207-59-1	Sorafenib tosilato	x		x	x		
23541-50-6	Daunorrubicina	x		x			

Figura 1. Compuestos seleccionados a partir del *docking* molecular para los dominios RRM de las proteínas TbRRM1 y TcSR62. Para el *docking* molecular se utilizó la herramienta ICM Pocket Finder y Virtual Ligand Screening de ICM Pro. Se seleccionaron los compuestos con mejor score. La X indica el dominio RRM con el que interactuaría el compuesto. Los compuestos fueron adquiridos en Merck.

- 2. Evaluar la eficacia de las diferentes drogas candidatas en cultivos axénicos de los diferentes estadios del *T. cruzi*.** Este objetivo se encuentra avanzado en más de un 80%. Obtenidas las drogas se procedió a evaluar el efecto tripanocida en dos concentraciones diferentes (10µM y 100µM) sobre tripomastigotes y sólo en una concentración alta (100µM) para epimastigotes de *T. cruzi*. Los resultados mostraron que habría 3 compuestos con efectos tripanocidas para tripomastigotes provenientes de células Vero infectadas (Benserazida, daunorrubicina y sorafenib tosilato) y dos compuestos con efectos deletéreos sobre la cantidad de parásitos del estadio epimastigote (pirantel pamoato y daunorrubicina (**Figura 2**). Habiendo comprobado qué compuestos presentaron un efecto tripanocida, se continuó con el estudio de sus propiedades farmacológicas *in vitro*.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

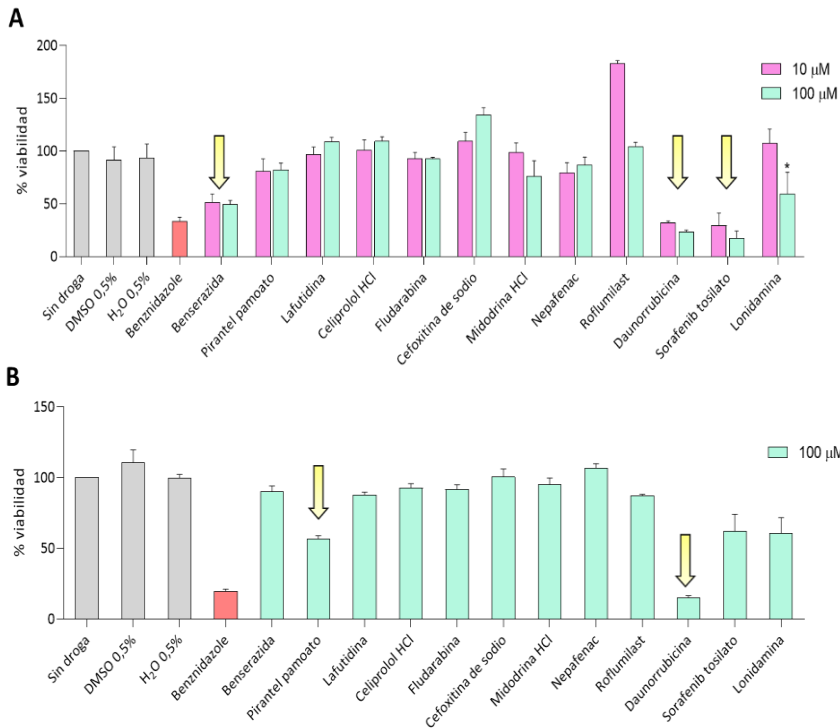


Figura 2. Viabilidad de parásitos de los estadios tripomastigote y epimastigote en presencia de los compuestos. **A.** Gráfico del porcentaje de parásitos viables del estadio tripomastigote luego del tratamiento por 24 hs con 10 µM ó 100 µM de los compuestos. **B.** Gráfico de porcentaje de parásitos viables del estadio epimastigote con 100 µM de las drogas candidatas luego de 48 hs de tratamiento. La viabilidad en cada estadio se realizó por agregado de resazurina y medición de la fluorescencia a 595 nm. Las flechas amarillas indican los compuestos candidatos para continuar con el estudio en base a la disminución en el porcentaje de viabilidad. Las barras de error indican el DS de al menos dos réplicas técnicas.

A continuación, se analizaron los perfiles farmacológicos de las drogas candidatas. Se encontró que el compuesto sorafenib tosilato presenta el mejor perfil farmacológico sobre el estadio tripomastigote con una concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de 1.2µM. Luego le siguen la daunorrubicina con una IC₅₀=7.7µM y benserazida con IC₅₀=14.7µM. Para los epimastigotes, sólo pudo evaluarse el perfil farmacológico del Pirantel pamoato debido a que no fue suficiente la cantidad de daunorrubicina para el ensayo del perfil farmacológico sobre epimastigotes. El Pirantel sobre los epimastigotes arrojó una IC₅₀= 1.18µM (ver **Figura 3**).

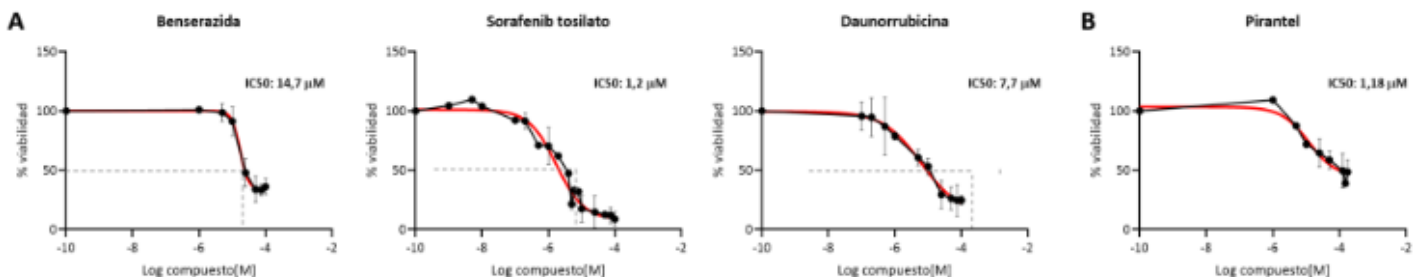


Figura 3. Curvas dosis-respuesta de cuatro de los compuestos seleccionados. Los porcentajes de viabilidad se determinaron por el ensayo de resazurina en presencia de distintas concentraciones de los compuestos en parásitos del estadio tripomastigote (**A**) o epimastigote (**B**). Para tripomastigotes, 1×10^6 parásitos/ml fueron tratados con benserazida, daunorrubicina y sorafenib tosilato por 24 hs. Para epimastigotes, se incubaron 1×10^7 parásitos/ml con distintas concentraciones de pirantel por 48 hs. Como control se incubó con DMSO 0,5 %. Se muestran los resultados de tres réplicas biológicas para los ensayos en tripomastigotes y dos réplicas biológicas para epimastigotes con sus respectivos DS. Las IC₅₀ se calcularon mediante el programa GraphPad Prism 9 realizando el ajuste (en rojo) a una curva dosis-respuesta utilizando el modelo de pendiente variable (cuatro parámetros).



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

Debido a que la cantidad de daunorrubicina obtenida de MERCK no fue suficiente para estos estudios y dada la imposibilidad de volver a adquirirla por razones de tiempo y cuestiones económicas, se solicitó una donación al laboratorio Varifarma, que recientemente comenzó con la comercialización de la misma. Por lo tanto, los ensayos posteriores se realizaron con la daunorrubicina nacional. Posteriormente, las drogas que presentaron efectos en el estadio de tripomastigote provenientes de cultivo de células Vero, fueron ensayadas específicamente en tripomastigotes metacíclicos derivados de un cultivo envejecido de epimastigotes. Los resultados mostraron que el sorafenib presenta una $IC_{50_{24hs}}=13.52\mu M$ (Figura 4) y una $IC_{50_{48hs}}=14\mu M$ (datos no mostrados), mientras que no se observó efecto tripanocida en este estadio para pirantel pamoato y daunorrubicina.

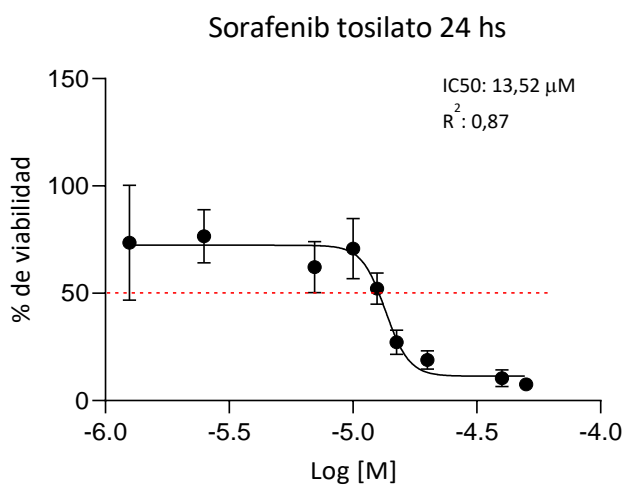


Figura 4: Curvas dosis-respuesta del sorafenib tosionato en parásitos del estadio metacíclico. Los porcentajes de viabilidad se determinaron por conteo en cámara de Neubauer en presencia de distintas concentraciones del sorafenib tosionato luego de 24 hs. Para ello 1×10^6 parásitos/ml fueron tratados con distintas concentraciones de sorafenib tosionato. Como control se incubó con DMSO 0,5 % y con benznidazol 20 mM como control negativo de viabilidad. Se muestran los resultados de al menos 2 réplicas biológicas independientes con sus respectivos DS. Las IC_{50} se calcularon mediante el programa GraphPad Prism 9 realizando el ajuste a una curva dosis-respuesta utilizando el modelo de pendiente variable (cuatro parámetros).

Finalmente, se realizaron ensayos de toxicidad de las diferentes drogas sobre células Vero. Los resultados mostraron que las drogas no presentan efectos nocivos sobre estas células, incluso a concentraciones más altas que el IC_{50} determinado en distintos estadios de *T. cruzi* (Figura 5).

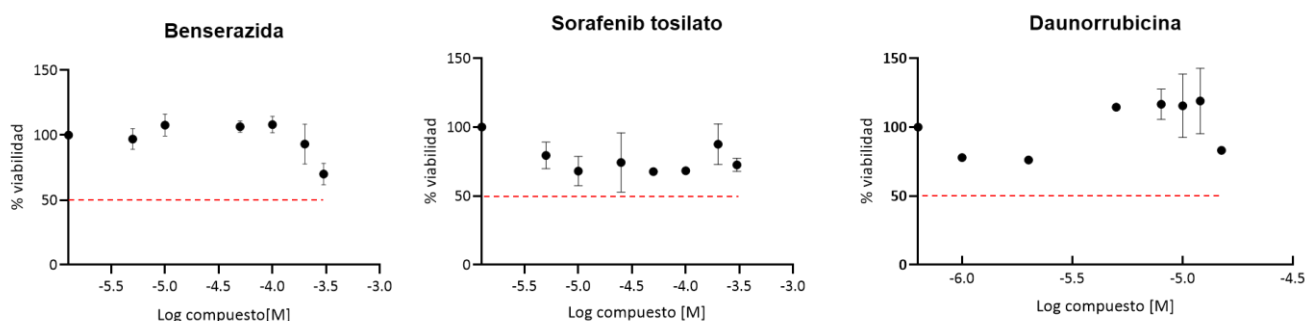


Figura 5. Determinación de la toxicidad de los compuestos en células Vero. 10^4 células/pocillo fueron sembradas en placa de 96 wells e incubadas por 24 hs antes del tratamiento con distintas concentraciones de los compuestos (300 mM - 5mM para benserazida y sorafenib tosionato y 20 mM - 1mM para daunorrubicina) y DMSO 0,5% como control. Luego de 24 hs de incubación la viabilidad celular se determinó por tinción con cristal violeta medición de la absorbancia a 570 nm. Para los tres compuestos probados la IC_{50} fue mayor a las concentraciones ensayadas. Se muestran los resultados de dos réplicas biológicas para los compuestos benserazida y sorafenib tosionato y una réplica biológica para daunorrubicina con los respectivos desvíos estándar.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

3. Evaluar y comparar la eficacia de las diferentes drogas con el benznidazol en un modelo murino de infección aguda-crónica.

Este objetivo aún no ha podido ser abordado.

Conclusiones generales: A partir del modelado seguido de *docking* molecular de los dominios de la proteína TcSR62 de *T. cruzi* y de su ortóloga en *T. brucei*, se obtuvo una lista de diversos compuestos que fueron ensayados en diferentes cepas de *T. cruzi*. Algunos de ellos presentaron alta actividad tripanocida en diferentes estadios del parásito y no presentaron toxicidad en células de mamífero. Aún resta evaluar si estos compuestos pueden alterar la tasa de infección de *T. cruzi* en células de mamífero y ensayar si afecta la replicación del estadio intracelular de amastigote. Finalmente, queda pendiente evaluar si la daunorrubicina de origen nacional presenta el mismo perfil farmacológico que la obtenida en MERCK. Con esos datos, se procederá al abordaje del 3er objetivo de manera de evaluar *in vivo* los efectos de las distintas drogas que presentaron efectos *in vitro*. Además, gracias al abordaje del objetivo 1 de este proyecto, puede abrirse al menos una nueva línea de Investigación acerca de los efectos de las drogas identificadas sobre *T. brucei*, que excede a los objetivos aquí planteados.

Dificultades encontradas: Como se mencionó en el primer informe, durante el desarrollo del presente proyecto nos encontramos con numerosos desafíos. El primero fue la imposibilidad de acceder al laboratorio debido al aislamiento social preventivo y obligatorio ante la pandemia de coronavirus. Esto causó el vencimiento de las licencias de software para el modelado molecular previstas para ser usadas durante el desarrollo del presente proyecto, por lo que tuvimos que pedir ayuda a unos colaboradores del exterior (Benacerraf y Cardozo) para que nuestro proyecto no se vea interrumpido. Del abordaje del modelado, se decidió encarar la proteína completa y no sólo los dominios dedos de zinc, e incluir a la proteína TbRRM1 de *T. brucei*. Como los resultados fueron muy prometedores, dada la rareza del RRM1 y la drogabilidad de los dominios RRM2 y RRM3, se continuó con la identificación de drogas que pudieran inhibirlos. Otra de las dificultades con la que nos encontramos es que solo algunas drogas identificadas están disponibles en laboratorios nacionales, mientras que la empresa internacional MERCK es la única que ofrece en Argentina drogas puras, pero a precio dólar. Para poder comenzar a adquirir las drogas, tuvimos que realizar un trámite de alta de cliente que llevó aproximadamente un mes y medio, y dado que la UNLaM es ahora cliente nuevo, los presupuestos carecen de los descuentos (en dólares) que poseen otras UUNN. Por otro lado, la importación de estas drogas usualmente demora entre 30 y 45 días, tiempo que demora también la facturación de los productos.

Con respecto a la segunda mitad del período subsidiado, no se encontraron grandes dificultades. Únicamente se podría destacar que la empresa MERCK por error, facturó en dólares, 5 de las drogas compradas y todo el proceso de refacturación llevó casi 9 meses. El subsidio se ejecutó en su totalidad y aún restan algunos experimentos para poder plasmar los resultados en una publicación.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

B. Principales resultados de la investigación

B.1. Publicaciones en revistas (informar cada producción por separado)

Artículo 1:	
Autores	
Título del artículo	
N° de fascículo	
N° de Volumen	
Revista	
Año	
Institución editora de la revista	
País de procedencia de institución editora	
Arbitraje	Elija un elemento.
ISSN:	
URL de descarga del artículo	
N° DOI	

B.2. Libros

Libro 1	
Autores	
Título del Libro	
Año	
Editorial	
Lugar de impresión	
Arbitraje	Elija un elemento.
ISBN:	
URL de descarga del libro	
N° DOI	

B.3. Capítulos de libros

Autores	
Título del Capítulo	
Título del Libro	
Año	
Editores del libro/Compiladores	
Lugar de impresión	
Arbitraje	Elija un elemento.
ISBN:	
URL de descarga del capítulo	
N° DOI	



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

B.4. Trabajos presentados a congresos y/o seminarios

Autores	Ana Laura Benacerraf, Analía G. Níttolo, Daniel O. Sánchez, Timothy Cardozo, Gabriela V. Levy
Título	Inferring the function of <i>T. brucei</i> TbRRM1 via a model of its 3D structure.
Año	2020
Evento	XXXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología
Lugar de realización	Virtual
Fecha de presentación de la ponencia	18, 19 y 20 de noviembre de 2020
Entidad que organiza	Sociedad Argentina de Protozoología
URL de descarga del trabajo (especificar solo si es la descarga del trabajo; formatos pdf, e-pub, etc.)	Libro de resúmenes: https://campus.mednet.com.ar/plugin-file.php/3019/mod_page/content/143/Libro%20de%20res%C3%BAmenes%20SAP%202020-.pdf
Autores	Níttolo, Analía G.; Couce, Melanie; Chidichimo, Agustina M.; Gonzalez, Federico; Benacerraf Ana; Cardozo, Timothy; Levy, Gabriela V.
Título	Búsqueda de nuevos blancos terapéuticos en la Enfermedad de Chagas: Caracterización de la proteína TcSR62 de <i>Trypanosoma cruzi</i> "
Año	2022
Evento	XI Congreso SAP
Lugar de realización	Mendoza, Argentina
Fecha de presentación de la ponencia	16 al 18 de Marzo de 2022
Entidad que organiza	Sociedad Argentina de Protozoología
URL de descarga del trabajo (especificar solo si es la descarga del trabajo; formatos pdf, e-pub, etc.)	Libro de resúmenes: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/17095/resumes-congreso-sap.pdf

B.5. Otras publicaciones

Autores	
Año	
Título	
Medio de Publicación	



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

C. Otros resultados. Indicar aquellos resultados pasibles de ser protegidos a través de instrumentos de propiedad intelectual, como patentes, derechos de autor, derechos de obtentor, etc. y desarrollos que no pueden ser protegidos por instrumentos de propiedad intelectual, como las tecnologías organizacionales y otros. Complete un cuadro por cada uno de estos dos tipos de productos.

C.1. Títulos de propiedad intelectual. Indicar: Tipo (marcas, patentes, modelos y diseños, la transferencia tecnológica) de desarrollo o producto, Titular, Fecha de solicitud, Fecha de otorgamiento

Tipo	Titular	Fecha de Solicitud	Fecha de Emisión

C.2. Otros desarrollos no pasibles de ser protegidos por títulos de propiedad intelectual. Indicar: Producto y Descripción.

Producto	Descripción

D. Formación de recursos humanos. Trabajos finales de graduación, tesis de grado y posgrado. Completar un cuadro por cada uno de los trabajos generados en el marco del proyecto.

D.1. Tesis de grado

Director (apellido y nombre)	y Autor (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título de la tesis

D.2 Trabajo Final de Especialización

Director (apellido y nombre)	y Autor (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título del Trabajo Final

D.2. Tesis de posgrado: Maestría

Director (apellido y nombre)	y Tesista (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título de la tesis

D.3. Tesis de posgrado: Doctorado

Director (apellido y nombre)	y Tesista (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título de la tesis



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLAM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

D.4. Trabajos de Posdoctorado

Director (apellido y nombre)	Posdoctorando (apellido y nombre)	Institución	Calificación	Fecha /En curso	Título del trabajo	Publicación

E. Otros recursos humanos en formación: estudiantes/ investigadores (grado/posgrado/posdoctorado)

Apellido y nombre del Recurso Humano	Tipo	Institución	Período (desde/hasta)	Actividad asignada ²
Níttolo, Analía Gabriela	Postdoctorado	CONICET-IIBio-UNSAM	2019-2022	Experimentos de evaluación de efectos tripanocidas, diseño de experimentos y mantenimiento general de las cepas en cultivo.
Gonzalez, Federico	Estudiante de Medicina	CIN-Dpto. de Ciencias de la Salud, UNLAM	2021-2022	Experimentos de evaluación de efectos de toxicidad. Búsqueda de bibliografía y análisis de resultados.

F. Vinculación³: Indicar conformación de redes, intercambio científico, etc. con otros grupos de investigación; con el ámbito productivo o con entidades públicas. Desarrolle en no más de dos (2) páginas.

Como se mencionó, para el abordaje del primer objetivo se estableció una colaboración con el Dr. Timothy Cardozo y su equipo del Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular de la Universidad de New York para el modelado y *docking* molecular de los diferentes dominios de las proteínas TbRRM1 y TcSR62.

G. Otra información. Incluir toda otra información que se considere pertinente.

--

² Descripción de la/s actividad/es a cargo (máximo 30 palabras)

³ Entendemos por acciones de “vinculación” aquellas que tienen por objetivo dar respuesta a problemas, generando la creación de productos o servicios innovadores y confeccionados “a medida” de sus contrapartes.



Código	FPI-009
Objeto	Guía de elaboración de Informe final de proyecto
Usuario	Director de proyecto de investigación
Autor	Secretaría de Ciencia y Tecnología de la UNLaM
Versión	5
Vigencia	03/9/2019

H. Cuerpo de anexos:

- Anexo I: Copia de cada uno de los trabajos mencionados en los puntos B, C y D, y certificaciones cuando corresponda.⁴
- Anexo II:
 - FPI-013: Evaluación de alumnos integrantes. (si corresponde)
 - FPI-014: Comprobante de liquidación y rendición de viáticos. (si corresponde)
 - FPI-015: Rendición de gastos del proyecto de investigación acompañado de las hojas foliadas con los comprobantes de gastos.
 - FPI-035: Formulario de reasignación de fondos en Presupuesto.
- Anexo III: Alta patrimonial de los bienes adquiridos con presupuesto del proyecto (FPI 017)
- Nota justificando baja de integrantes del equipo de investigación.

Firma y aclaración
del director del proyecto.

Lugar y fecha : San Justo, 16 de Julio de 2022

Cargar este formulario junto con los documentos correspondientes exclusivamente al Anexo I en SIGEVA UNLaM.

Enviar toda la documentación anterior más la correspondiente al ANEXO II junto con los comprobantes de gastos escaneados, en archivo PDF por correo electrónico a la Secretaría de Investigaciones Departamental investigacionessalud@unlam.edu.ar .

- Presentar una copia impresa firmada del presente documento junto con los Anexos, y enviar todo en archivo PDF por correo electrónico a la Secretaría de Investigación Departamental. **Límite de entrega: 28 de febrero de 2020**

⁴ En caso de libros, podrá presentarse una fotocopia de la primera hoja significativa o su equivalente y el índice.