

COMUNICACIÓN BREVE

Identificación de drogas que inhiben la funcionalidad de proteínas de unión al ARN en tripanosomátidos.

Identification of drugs that inhibit the functionality of RNA-binding proteins in trypanosomatids.

Identificação de drogas que inibem a funcionalidade de proteínas de ligação ao RNA em Tripanossomatídeos.

Níttolo, Analia Gabriela^{1*}; Corso, María Clara^{2,3}; Levy, Gabriela Vanesa^{1,2,3}

Recibido: 8 de abril de 2024 . Aceptado: 16 de mayo de 2024.

¿Qué se sabe?

Las proteínas de unión a ARN en tripanosomátidos cumplen un papel importante en la regulación de la expresión génica tanto a nivel transcripcional, facilitando la separación de las cadenas de ARN nacientes del ADN, como post-transcripcional a través de la regulación del destino de los ARNm blanco, para lo cual, las proteínas de unión a ARN adquieren una importancia esencial. Por lo tanto, dada su relevancia en el metabolismo y la sobrevivencia de parásitos, la inhibición de este tipo de proteínas mediante compuestos que interfieran en sus interacciones permitiría la eliminación de estos parásitos y el tratamiento de los pacientes infectados.

¿Qué aporta este trabajo?

En este trabajo estudiamos el efecto de compuestos de reposicionamiento obtenidos mediante modelado y *docking* molecular de los dominios RRM de la proteína de unión a ARN TbRRM1 de *T. brucei* en la viabilidad de los parásitos. Los resultados mostraron que la daunorrubicina es una droga con alto perfil tripanocida y que además presentó una IC50 más de cuatro veces mayor en una línea de parásitos que sobreexpresa la proteína TbRRM1. Estos resultados posicionan a esta proteína como un potencial blanco de la daunorrubicina para el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades causadas por tripanosomas.

Resumen

Trypanosoma cruzi y *Trypanosoma brucei* causan la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño, respectivamente. No existen vacunas y los tratamientos disponibles son poco efectivos. El estudio de proteínas relevantes para el parásito representa blancos terapéuticos prometedores. Considerando a la proteína de unión de ARN TbRRM1 como blanco, se propone a la daunorrubicina como compuesto terapéutico y se evalúa su efectividad en la sobrevivencia de *T. brucei*.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, proteínas de unión a ARN, reposicionamiento de drogas, daunorrubicina, concentración 50 inhibidora.

*Correspondencia: Analia Gabriela Níttolo ananittolo@unlam.edu.ar

1 Universidad Nacional de La Matanza, Departamento de Ciencias de la Salud, San Justo, Argentina.

2- Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

3- Escuela de Bio y Nanotecnologías (EByN), Universidad Nacional de San Martín.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

Abstract

Trypanosoma cruzi and *Trypanosoma brucei* cause Chagas disease and African sleeping sickness, respectively. There are no vaccines and existing treatments are ineffective. The study of proteins relevant to the parasite presents promising therapeutic targets. Considering the RNA-binding protein TbRRM1 as a target, daunorubicin is proposed as a therapeutic compound, and its effectiveness in the survival of *T. brucei* is evaluated.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, RNA-binding proteins, drug repositioning, daunorubicin, inhibitory concentration 50.

Resumo

Trypanosoma cruzi e *Trypanosoma brucei* causam a doença de Chagas e a doença do sono, respectivamente, para as quais não há vacinas e os tratamentos existentes são pouco eficazes. O estudo de proteínas relevantes para o parasita representa alvos terapêuticos promissores. Considerando a proteína de ligação ao RNA TbRRM1 como alvo, a daunorrubicina é proposta como composto terapêutico e sua eficácia na sobrevivência de *T. brucei* é avaliada.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, proteínas de ligação a RNA, reposicionamento de medicamentos, daunorrubicina, concentração inibidora 50.

Fuentes de financiamiento:

- Programa de Incentivos a Docentes Investigadores- PROINCE UNLaM E-019. IR Dra. Gabriela V. Levy.
- Vincular UNLaM 2020. IR Dra. Gabriela V. Levy.
- Programa de Investigación Científica, Desarrollo y Transferencia de Tecnología e Innovaciones de la Universidad Nacional de La Matanza (CyTMA2 C2SAL-072). IR Dra. Analía G. Níttolo.

Conflicto de intereses:

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Introducción

Los tripanosomátidos son parásitos protozoarios que producen enfermedades en humanos y animales consideradas desatendidas. Entre las enfermedades producidas por estos parásitos se encuentra la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, una zoonosis potencialmente mortal que se desarrolla en 21 países de América Latina y es endémica de nuestro país, cuyo agente etiológico es el parásito *Trypanosoma cruzi* (1). La enfermedad de Chagas presenta dos etapas: una etapa aguda, asintomática en la mayoría de los casos y una fase crónica, en la que aproximadamente un tercio de los pacientes puede desarrollar problemas cardíacos o digestivos. Las cardiomiopatías presentan gran morbilidad y mortalidad, y se generan por la persistencia del parásito durante un tiempo prolongado en el tejido cardíaco, causando daño por su acción y por la gran inflamación (2). En nuestro país, según datos del Ministerio de Salud de la Nación, existen 2 millones de individuos infectados y en zonas endémicas la mayor cantidad de nuevos casos se producen en niños menores de 14 años y sobre todo en menores de 5 años (3). En la actualidad se dispone de dos fármacos indicados para la etapa aguda, sin embargo, los tratamientos no resultan satisfactorios debido a que producen efectos adversos en los pacientes y resistencia de los parásitos.

La enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana cuyo agente etiológico es *T. brucei*, amenaza a más de 60 millones de personas en 36 países de África subsahariana. Las poblaciones más expuestas a contraer la enfermedad son aquellas que viven en zonas rurales remotas con acceso limitado a servicios de salud, lo que dificulta su diagnóstico y tratamiento (4). En la actualidad existen cuatro medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad del sueño, que se administran en función de la subespecie de *T. brucei* detectada y de la etapa de infección (aguda o crónica) en la que se diagnostique al paciente (5). Desafortunadamente, no existen vacunas contra las enfermedades causadas por tripanosomas y los tratamientos farmacológicos que se emplean presentan alta toxicidad y solo son efectivos durante la etapa aguda de la infección. Esto último, pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de las tripanosomiasis.

Además de la importancia de los tripanosomátidos por su relevancia médica, el estudio de estos organismos resulta de gran interés ya que presentan peculiaridades biológicas únicas entre los eucariotas (6). Sus genes se encuentran ordenados en unidades de transcripción policistrónicas, que se procesan generando ARN mensajeros individuales mediante *trans-splicing* y poliadenilación (7). Dada la arquitectura genética especial de los tripanosomátidos, muy pocas regiones regulatorias han sido reportadas y se ha demostrado que la regulación de la expresión génica depende, en gran medida, de mecanismos de control post-transcripcional (8). En este contexto, las proteínas involucradas en la regulación del procesamiento, estabilidad y traduc-

ción de mensajeros son fuertes candidatas para ensayos de potenciales tratamientos. Las proteínas de unión al ARN TbRRM1 presente en *T. brucei* y su ortóloga en *T. cruzi*, TcSR62, representan blancos terapéuticos prometedores, ya que son esenciales para la supervivencia del parásito y están ausentes en el hospedador mamífero. En este trabajo proponemos que la función de estas proteínas puede ser interferida mediante compuestos que inhiban sus interacciones y puedan convertirse en un tratamiento efectivo para pacientes con tripanosomiasis.

Materiales y métodos

Cultivo de parásitos

Los parásitos procíclicos de la línea 29.13 (*wild type*), que expresan la ARN polimerasa T7 y el represor de tetraciclina (TET) fueron mantenidos en medio de cultivo SDM-79 suplementado con 10% de suero fetal bovino en estufa a 28°C (9). Estos parásitos crecieron en presencia de 50 µg/ml de higromicina y 15 µg/ml de G418. La línea de parásitos procíclicos para la sobreexpresión de TbRRM1 fue generada a partir de la línea 29.13 y mantenida, además, con 1 µg/ml de puromicina. La sobreexpresión se realizó con el agregado de 1 µg/ml de TET por 48 horas.

Construcción para la sobreexpresión de TbRRM1 en el estadio procíclico

Para la sobreexpresión de TbRRM1 se realizó la construcción en el vector pLEW100v5 inducible por TET. En este vector se clonó la proteína TbRRM1 etiquetada con 3xFLAG en su extremo amino terminal.

Western blot

Las muestras correspondientes a los cultivos sin inducir y a los parásitos luego de 48 horas de inducción con TET fueron sembrados en gel de poliacrilamida-bisacrilamida 29:1 al 12% y corridos a 120 V en cubas de corrida vertical. La transferencia a membranas de nitrocelulosa se realizó a 0,2 A. Se utilizó como solución de bloqueo TBS 5% leche. Se utilizó el anticuerpo primario Anti-FLAG de ratón (Sigma) y un suero de conejo anti-enolasa (cedido por el Dr. Dante Maugeri). Los anticuerpos anti-ratón o anti-conejo conjugados a peroxidasa (Thermo Scientific) se utilizaron como anticuerpos secundarios. La detección de proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando el reactivo SuperSignal West Pico (Thermo Scientific) y la señal emitida fue detectada mediante placas radiográficas (AGFA).

Compuestos

Los compuestos benserazide, pirantel pamoato, lafutidina, celi-prolol, fludarabina, cefoxitina, midodrina, nepafenac, roflumilast, sorafenib tosilato y lonidamina se adquirieron en la empresa Sigma/Merck mientras que daunorrubicina y paclitaxel se adquirieron del Laboratorio Varifarma. Las drogas fueron solubilizadas en dimetil sulfoxido (DMSO) a una concentración

stock de 40 mM.

Tratamiento con los compuestos y evaluación de la viabilidad

Para determinar el efecto sobre la viabilidad de los parásitos, se incubaron 1×10^6 células/ml por 48 horas con concentraciones de 10 ó 100 μM de los compuestos candidatos durante 48 horas. Luego, las muestras se transfirieron por triplicado a placas negras de 96 wells y se realizó la incubación con 44 μM de resazurina por 4 horas a 28°C en oscuridad. Finalizada la incubación, la fluorescencia emitida se evaluó en lector de placa Beckman Coulter DTX 800 a 535-595 nm de excitación-emisión, respectivamente. Para determinar la IC50 de uno de los compuestos candidatos, (daunorrubicina) se utilizaron 12 diluciones seriadas de la droga (de 100 a 0,5 μM) por 48 horas. Se determinó la viabilidad en cada punto mediante el ensayo con resazurina.

Estudios estadísticos

Cada valor obtenido fue relativizado al control con vehículo correspondiente a DMSO 0,1% o DMSO 1% para 10 ó 100 μM de los compuestos, respectivamente.

La IC50 para el ensayo de viabilidad en parásitos con sobreexpresión inducible por tetraciclina (TET) se calculó mediante el programa GraphPad Prism 9 realizando el ajuste a una curva dosis-respuesta utilizando el modelo de pendiente variable (cuatro parámetros).

Resultados

Con el objetivo de inhibir la funcionalidad de las proteínas de

unión a ARN TcSR62 de *T. cruzi* y TbRRM1 de *T. brucei*, se partió de una serie de compuestos que surgieron del *docking* molecular de los dominios RRM en el marco de otro proyecto.

Dado que *T. brucei* presenta diversas herramientas moleculares como el sistema de ARN de interferencia (ARNi) ausente en *T. cruzi*, y que la subespecie *T. brucei brucei* no es patógena para humanos, se eligió este modelo, para comenzar las pruebas de los compuestos candidatos.

La viabilidad de parásitos procíclicos de la línea 29.13 *wild type* en presencia de 12 de los compuestos candidatos se evaluó mediante el ensayo de resazurina. La resazurina es un indicador azul en su forma no fluorescente que es reducida a resofurina (color rosado, fluorescente) por las enzimas oxidorreductasas presentes en la mitocondria de células viables. La resofurina es secretada al medio permitiendo evaluar la proliferación y/o la citotoxicidad de diferentes compuestos sobre las células (10). Por lo tanto, la medición de la fluorescencia de la resofurina permite monitorear la viabilidad celular.

En el presente trabajo nos centramos en el efecto de distintos compuestos candidatos seleccionados mediante *docking* molecular a partir de una biblioteca de drogas de reposicionamiento, de los dominios RRM de unión a ARN de la proteína TbRRM1 de *T. brucei*. Se realizó un primer *screening* evaluando la sobrevivencia de los parásitos luego de 48 horas de incubación en presencia o ausencia de cada una de las 12 drogas elegidas y en dos concentraciones: 10 ó 100 μM (Figura 1).

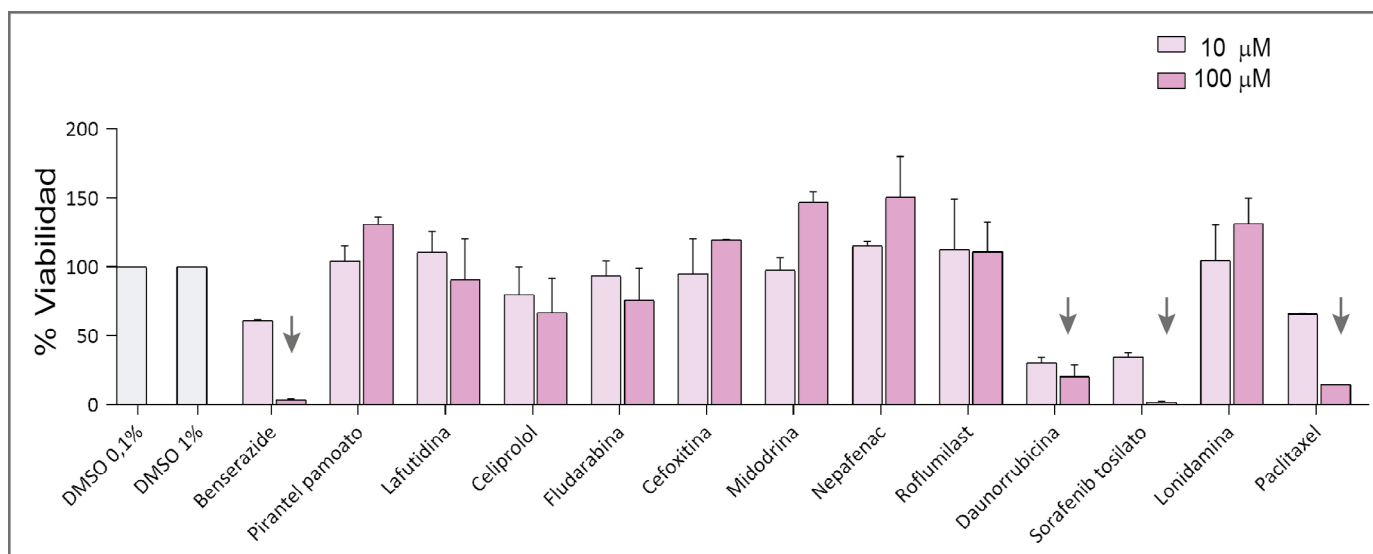


Figura 1. Viabilidad de parásitos 29.13 *wild type* del estadio procíclico en presencia de los compuestos candidatos. Gráfico del porcentaje de parásitos viables luego del tratamiento por 48 horas con 10 μM ó 100 μM de los compuestos. La viabilidad se realizó por agregado de resazurina y medición de la fluorescencia a 595 nm. Las flechas grises 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 tres réplicas técnicas.

Luego de un primer análisis obtuvimos resultados prometedores para los compuestos benserazide, daunorrubicina, sorafenib tosilato y paclitaxel. A partir de estos resultados decidimos validar el ensayo del *docking* molecular evaluando si el efecto tripanocida que observamos se debe a la interacción con la proteína TbRRM1. Para ello decidimos elegir uno de los compuestos: la daunorrubicina, ya que esta droga presentó un efecto tripanocida a una concentración de 10 μM . A continuación, calculamos

la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) del compuesto en parásitos que sobreexpresan la proteína TbRRM1 de manera inducible con tetraciclina (TET) (Figura 2A). Como resultado obtuvimos que los parásitos sin inducir (TET⁻) presentaron una IC₅₀ de 1,09 μM mientras que la IC₅₀ obtenida luego de 48 horas de sobreexpresión de TbRRM1 fue de 5 μM , es decir, más de cuatro veces mayor con respecto al cultivo sin inducir (Figura 2B)

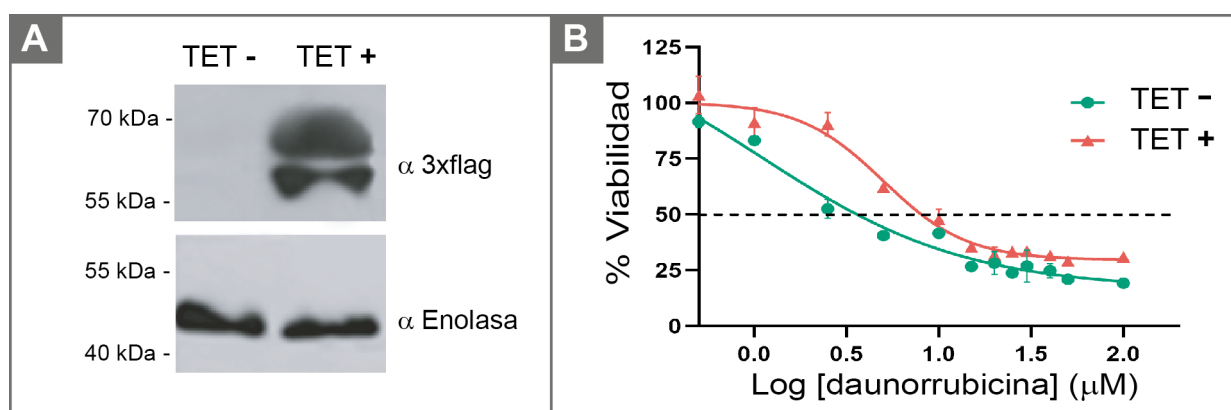


Figura 2. Sobreexpresión de TbRRM1 y efectos sobre la viabilidad en *T. brucei*. A. Western blot luego de 48 horas de inducción con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de TET en cultivo de parásitos sin inducir (TET⁻) y en cultivo. B. Ensayo de viabilidad por resazurina. Los porcentajes de viabilidad se determinaron a distintas concentraciones daunorubicina. Las IC₅₀ se calcularon mediante el programa GraphPad Prism 9 realizando el ajuste (en verde para TET⁻ y en rojo para TET⁺) a una curva dosis-respuesta utilizando el modelo de pendiente variable (cuatro parámetros). TET⁻ R²= 0,96; IC₅₀= 1,093 μM . TET⁺ R²= 0,97; IC₅₀= 5,015 μM .

Discusión

En este trabajo nos propusimos realizar la búsqueda de compuestos que inhiban la función de proteínas relevantes para la sobrevivencia de los parásitos, en particular de la proteína TbRRM1 de *T. brucei* mediante el modelado de los dominios RRM y la búsqueda de fármacos inhibitorios por *docking* molecular a partir de una biblioteca de drogas de reposicionamiento. Los compuestos benserazide, daunorrubicina, sorafenib tosilato y paclitaxel disminuyeron la viabilidad de los parásitos en más de un 75% (Figura 1). Posteriormente, logramos validar el resultado obtenido del *docking* molecular, que permitió en primera instancia proponer a la daunorrubicina como inhibidor de los dominios RRM de la TbRRM1. Para esto, desarrollamos una estrategia que nos permitió determinar si el efecto tripanocida de la daunorrubicina se correspondía efectivamente con la interacción entre la droga y la proteína TbRRM1. Se puso a punto un modelo en *T. brucei* de sobreexpresión de TbRRM1 inducible por TET, en el cual se evaluó nuevamente el efecto de la daunorrubicina. Encontramos que la IC₅₀ de la daunorrubicina en parásitos con sobreexpresión inducible de TbRRM1 (TET⁺) resultó ser más de cuatro veces mayor con respecto a la IC₅₀ en los cultivos de los parásitos sin inducir (TET⁻) (Figura 2). Este

resultado sugiere fuertemente que el efecto tripanocida de la daunorrubicina se debería a la inhibición de los dominios RRM de TbRRM1, lo cual constituye un hallazgo novedoso acerca de la daunorrubicina sobre el metabolismo de los tripanosomátidos.

Conclusión

En este trabajo demostramos que cuatro compuestos de reposicionamiento: benserazide, daunorrubicina, sorafenib tosilato y paclitaxel, son capaces de inhibir el crecimiento de parásitos del estadio procíclico de *T. brucei*. En particular, la daunorrubicina mostró un potente efecto tripanocida a bajas concentraciones y además la IC₅₀ obtenida al sobreexpresar TbRRM1 resultó significativamente mayor sugiriendo que este compuesto estaría interactuando con los dominios RRM de TbRRM1, inhibiendo funciones vitales para el parásito. Teniendo en cuenta que se trata de compuestos de reposicionamiento cuyo uso ya ha sido aprobado en humanos, los resultados aquí mostrados permiten proponer nuevos fármacos en la búsqueda de tratamientos efectivos y factibles para el tratamiento de pacientes que presentan enfermedades causadas por tripanosomas.

Contribución de los/as autores:

AGN: realización de los ensayos de viabilidad con los distintos compuestos y aportó el financiamiento para llevar adelante este proyecto. MCC: revisión y preparación del manuscrito. Diseño de las figuras. GVL: diseño de los experimentos, el análisis de los resultados y el financiamiento para llevar a cabo el trabajo presentado.

Referencias

1. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1: 75–85.
2. Lander N, Chiurillo MA, Storey M, Vercesi AE, Docampo R. CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal Tagging of *Trypanosoma cruzi* Genes Reveals the Acidocalcisome Localization of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *J Biol Chem*. 2016;291:25505–25515.
3. Website. Available: OPS/OMS. Encuentro Nacional de Chagas: Argentina actualiza estrategia para lograr la eliminación de la transmisión. 2019. Disponible en: https://www.paho.org/arg/index.php?option=com_content&view=article&id=10343:encuentro-nacional-de-chagas-argentina-actualiza-estrategia-para-lograr-la-eliminacion-de-la-transmision&Itemid=226
4. Brun R, Blum J. Human African trypanosomiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26:261–273.
5. Steverding D. The development of drugs for treatment of sleeping sickness: a historical review. *Parasit Vectors*. 2010;3(1):15. doi: 10.1186/1756-3305-3-15
6. De Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. Gene expression regulation in trypanosomatids. Docampo R, editor. *Essays Biochem*. 2011;51:31-46. doi: 10.1042/bse0510031
7. Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;156(2):93-101. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.07.007
8. Stanne TM, Rudenko G. Active VSG Expression Sites in *Trypanosoma brucei* Are Depleted of Nucleosomes. *Eukaryot Cell*. enero de 2010;9(1):136-47.
9. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;99: 89–101.
10. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*. 2006;99: 103–107.