



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Identificación de proteasas nucleares en
*Plasmodium falciparum***

Tesis que presenta
Eustolia Isabel Quintana Mora

Para obtener el Grado de
Maestra en Ciencias

En la especialidad de
Biomedicina Molecular

Directora de Tesis
Dra. Rosaura Hernández Rivas
Co-Directora de Tesis
Dra. Rossana Arroyo Verástegui

Ciudad de México

Agosto, 2018

ASESORES

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Investigador titular 3C del Departamento
de Biomedicina Molecular CINVESTAV-
IPN

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Investigador titular 3C del Departamento
de Biomedicina Molecular CINVESTAV-
IPN

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de
Biomedicina Molecular del Centro de
Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de
la Dra. Rosaura Hernández Rivas y cotutoría de la
Dra. Rossana Arroyo Verástegui.**

**Durante la realización de este trabajo, la autora fue
becaria del Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología CONACyT con número de expediente
610489**

DEDICATORIAS

“Nadie nos salva si no nosotros mismos. Nadie puede y nadie debe. Nosotros mismos debemos recorrer el camino.”

Buda

A mis Padres, por creer en mí y mostrarme su apoyo incondicional, por comprender qué es lo que quiero hacer de mi vida y dejarme ser yo.

A mi hermano Toño, por saber escucharme y ser siempre sincero conmigo.

A mi familia, por ayudarme cuando lo he necesitado y por su comprensión.

A Ernesto, quién ha estado desde el principio de esta aventura y continua a mi lado, escuchando, comprendiendo y apoyándome en todo momento.

A Juan Carlos, por estar al inicio y por ya no estar, por enseñarme a comprender que hay personas que son el camino y no el destino.

“La dificultad a menudo prepara a una persona común para un destino extraordinario.” C. S. L.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosaura Hernández, por su guía durante el desarrollo de este proyecto, por compartir sus conocimientos y entusiasmo por la ciencia.

A la Dra. Rossana Arroyo por sus orientaciones y asesoría a lo largo de este proyecto.

A mis asesores Dr. Miguel Vargas y Dr. Nicolás Villegas por sus recomendaciones siempre oportunas durante el desarrollo de este trabajo.

A la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabólica del CINVESTAV-Zacatenco por las facilidades otorgadas en el uso del equipo "*Bioruptor-Pico*" para el desarrollo de este proyecto.

Al técnico José Luis Gómez Brito por su colaboración en la preparación del medio de cultivo, soluciones y aseo del diferente material ocupado durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio y mis compañeras de clases: Danny, Pedro, Lissuly, David, Roxana, Iván, Karen, Vero y Nadia, por los momentos agradables, divertidos, cómicos, de convivencia y apoyo mutuo.

A Carlos, Perla, Pily, Caro, Luis A, Diego y Elisa porque siempre están ahí cuando los necesito.

A mis amigos de siempre y a las nuevas amistades por hacer de mi estancia en esta ciudad algo agradable, divertido y con momentos inolvidables.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Impacto epidemiológico de la Malaria	1
1.2 Ciclo de vida	3
1.3 Generalidades de la Malaria	5
1.3.1 Manifestaciones Clínicas	5
1.3.2 Complicaciones	6
1.3.3 Diagnóstico	8
1.3.4 Tratamiento	9
1.3.4.1 Fármacos antimaláricos	10
1.3.4.1.1 Derivados de quinolona	10
1.3.4.1.2 Antifolatos	11
1.3.4.1.3 Artemisina y sus derivados	12
1.4 Generalidades de las proteasas	13
1.4.1 Clasificación de las proteasas	15
1.4.2 Inhibidores de proteasas	19
1.5 Participación de las proteasas en el ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>	22
1.5.1 Mecanismo de invasión de los eritrocitos	22
1.5.2 Proceso de degradación de la hemoglobina	25
1.5.3 Mecanismo de egreso de los eritrocitos	27
1.5.4 Sistema de degradación de proteínas	28
1.6 Proteasas nucleares en otros eucariotas	31
1.6.1 Procesamiento proteolítico de la histona H1	32
1.6.2 Procesamiento proteolítico de la histona H2A	33
1.6.3 Procesamiento proteolítico de la histona H3	34
1.6.4 Procesamiento proteolítico en otros componentes nucleares	37
1.7 Proteasas nucleares en <i>P. falciparum</i>	38
2. JUSTIFICACIÓN	43
3. HIPÓTESIS	43
4. OBJETIVO GENERAL	44
5. OBJETIVOS PARTICULARES	44
6. MATERIALES Y MÉTODOS	45
6.1 Cultivo <i>Plasmodium falciparum</i> cepa 3D7	45
6.2 Sincronización de los parásitos 3D7 de <i>P. falciparum</i> con sorbitol	45
6.3 Lisis por saponina	46
6.4 Extractos Nucleares	46
6.5 Extractos de Eritrocitos	47
6.6 Cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford	47
6.7 Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) para extractos de eritrocitos humanos, nuclear y citoplásmico de <i>P. falciparum</i>	48
6.8 Western Blot (WB)	50

6.9 Separación electroforética en gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina (Zimografía de gelatina)	51
6.10 Separación electroforética en gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina (Zimografía de gelatina) más incubación con inhibidores para las diferentes familias de proteasas.	52
6.11 Electroforesis Bidimensional (2D)	53
6.12 Tinción con plata	54
6.13 Espectrometría de masas	55
7. RESULTADOS	57
7.1 Análisis in silico sugiere la presencia de proteasas nucleares en <i>P. falciparum</i>	57
7.2 En <i>P. falciparum</i> existen otras proteasas nucleares	67
7.3 Las proteasas nucleares de <i>P. falciparum</i> presentan actividad de manera estadio específico.	73
7.4 Las proteasas nucleares encontradas para <i>P. falciparum</i> pertenecen a la familia de las serín y cisteín proteasas	75
7.5 Identificación de una proteasa nuclear	78
7.5.1 Subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L)	82
7.5.2 Plasmepsina II (Aspártico proteasa)	83
7.5.3 SERA 6 (Proteína rica en serina)	84
8. DISCUSIÓN	85
9. CONCLUSIONES	101
10. PERSPECTIVAS	102
11. BIBLIOGRAFÍA	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución actual de la malaria a nivel Mundial	1
Figura 2. Áreas de riesgo de malaria en México	2
Figura 3. Ciclo de vida de <i>P. falciparum</i>	5
Figura 4. Frotis frescos de sangre periférica de pacientes infectados con Plasmodium teñidos con Wright-Giemsa.	9
Figura 5. Interacción enzima-sustrato	16
Figura 6. Estructura del merozoíto y fases del mecanismo de invasión.	23
Figura 7. El rol de las proteasas durante el proceso de invasión del eritrocito.	25
Figura 8. El rol de las proteasas durante el mecanismo de egreso del eritrocito.	28
Figura 9. Representación esquemática de PfClpY/PfClpQ – PfClpC/PfClpP.	30
Figura 10. Modelo propuesto del papel de la proteólisis de las histonas en la regulación de la estructura y función de la cromatina.	37
Figura 11. Árbol filogenético de las calpaínas.	41
Figura 12. La mayoría de las proteasas reportadas en <i>P. falciparum</i> pertenecen a la familia de las cisteín y serín proteasas.	57
Figura 13. La mayoría de las posibles proteasas nucleares de <i>P. falciparum</i> son cisteín y serín proteasas.	66
Figura 14. La mayoría de las probables proteasas nucleares se expresan principalmente en la etapa de trofozoítos	67
Figura 15. Patrón diferencial de proteínas en los tres extractos obtenidos.	68
Figura 16. Los extractos nucleares no se encuentran contaminados con alguna otra fracción obtenida.	69
Figura 17. Representación esquemática del protocolo de zimografía empleado para detectar la actividad de proteasa de las proteínas nucleares de <i>P. falciparum</i> .	70
Figura 18. Existen proteasas en el núcleo de <i>P. falciparum</i>	71
Figura 19. Existen varias proteasas en el núcleo de <i>P. falciparum</i>	72
Figura 20. La actividad de las proteasas nucleares de <i>P. falciparum</i> es estadio-específico.	74
Figura 21. Representación esquemática del ensayo de zimografía en presencia de inhibidores.	76
Figura 22. Las proteasas presentes en el núcleo de <i>P. falciparum</i> pertenecen a la familia de las serín y cisteín proteasas.	77
Figura 23. Representación esquemática de la región del gel en donde se identificaron a las tres proteasas nucleares: FACT-L, Plasmepsina II y SERA 6.	81
Figura 24. Representación esquemática de los dominios importantes de la proteasa subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L)	82
Figura 25. Representación esquemática de los dominios que conforman a la proteasa plasmepsina II.	83
Figura 26. Representación esquemática de los dominios que conforman a la proteasa SERA 6	84
Figura 27. Representación esquemática de una de las subunidades que constituyen a FACT.	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Inhibidores de proteasas comerciales. Panel de inhibidores para serín, cisteín, métalo, treonin y aspártico proteasas, (https://www.sigmaaldrich.com/mexico.html)	20
Tabla II. Lista de las histonas procesadas y del organismos en donde ocurre este evento (Tomado y modificado de Azad G. et al., 2014)	32
Tabla III. Lista de proteasas con una probable localización nuclear en <i>P. falciparum</i> , identificadas a partir de un análisis in silico, organizadas de acuerdo al tipo de proteasa (cisteín, serín, aspártico, treonin y metalo proteasas).	58
Tabla IV. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas.	78
Tabla V. Proteasas detectadas mediante espectrometría de masas.	80

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
aa	Aminoácidos
AAA	ATPasas Asociadas a diversas Actividades
ACT	Terapia combinada con artemisininas
AEBSF	Clorhidrato de fluoruro de 4- (2-aminoetil) bencenosulfonilo
AMA1	Antígeno apical de membrana 1
BSA	Albúmina Sérica Bovina
Ca ²⁺	Calcio
Cf	Concentración final
ch2A	Histona corta H2A
ChIP	Inmunoprecipitación de la Cromatina
ChIP-Seq	Inmunoprecipitación de la cromatina acoplado a secuenciación masiva
CID	Coagulación intravascular diseminada
Clp	Proteasa procariotica caseinica
CO ₂	Dioxido de Carbono
CR1	Receptor de complemento 1
C-terminal	Carboxilo terminal
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHPS	Dihidropteroato Sintetasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPAP1	Dipeptidilpeptidasa 1
DPAP2	Dipeptidilaminopeptidasa 2
DTT	Ditiotetrol
E2F	Factor de transcripción E2F
E-64	N- (trans-Epoxisuccinil) -L-leucina 4-guanidinobutilamida
EBL	Proteína similar de unión al eritrocito
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EI	Eritrocitos infectados
ESC	Células madre embrionarias de ratón
Fe	Hierro
FKBP	Peptidil prolil isomerasa
FMDV	Virus de la fiebre aftosa
FPIX	Ferriprotoporfirina IX
g/L	Gramos por litro
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GRP	Globulos rojos parasitados
H1	Histona H1
H2A	Histona H2A
H2B	Histona H2B
H3	Histona H3

H3K27me2	Dimetilación en la lisina 27
H3K4me3	Trimetilación de la lisina 4 de la Histona H3
H4	Histona H4
Hc1	Histona corta 1
Hc2	Histona corta 2
HDP	Proteína de hemodetoxicación
HRP	Peroxidasa de rabano
HRP-2	Proteína rica en histidina 2
Hrs	Horas
HsIV	Locus V de choque térmico
ICAM-1	Molecula de adhesión intercelular
IUGR	Retraso del crecimiento intrauterino
K18	Residuo de lisina 18
K23	Residuo de lisina 23
KCL	Cloruro de potasio
kDa	Kilo Daltones
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
M	Molar
mAmp	Mili Ampers
Mb	Mega bases
MEROPS	Base de datos de proteasas, proteinasas y enzimas proteolíticas
MetAP	Met-aminopeptidasas
mg/mL	Miligramos por mililitro
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
MSP	Proteína de superficie del merozoíto
MSRP2	Proteína relacionada con la proteína de superficie del merozoíto 2
N ₂	Nitrógeno
Na ₂ HPO ₄	Fosfato disódico
NaCl	Cloruro de Sodio
ng/L	Nanogramos por litro
ng/mL	Nanogramos por mililitro
NLS	Secuencia de localización nuclear
nm	Nanómetros
N-terminal	Amino terminal
Nup62	Nucleoporina 62
O ₂	Oxigeno
OH	Grupo hidroxilo
P	Sustrato
PBS	Tampón fosfato salino
Pcalp	Calpaina de <i>P. falciparum</i>
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno

PLDH	Lactato deshidrogenasa asociada con <i>Plasmodium</i>
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
PTMs	Modificaciones postraduccionales de las histonas
PTRAMP	(proteína apical del merozoito tipo trombospondina de <i>Plasmodium</i>)
RAMA	Antígeno de membrana asociado a las roptrias
RAP1	Proteína asociada a las roptrias 1
rARN	Acido ribonucleico ribosomal
RBL	Proteína similar de unión al reticulocito
RhopH3	Proteína de las roptrias de alto peso molecular 3
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación masiva del RNA
RON2	Proteína de las roptrias 2
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Sitio activo de la enzima
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SERA	Antígeno repetido de serina
SUB1	Subtilisina 1
SUB2	Subtilisina 2
TEMED	N, N, N, N-tetrametiletenediamina
V	Volts
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VP	Vacuola parasitofora
WB	Westen Blot

RESUMEN

La malaria, es la principal parasitosis a nivel mundial, esta enfermedad es causada por parásitos del género *Plasmodium*, y es *P. falciparum* el que produce la mayor mortalidad. En la búsqueda de nuevas terapias para contrarrestar a esta parasitosis, las proteasas han surgido como posibles blancos. Esto se debe a que las proteasas en este parásito juegan un papel muy importante en una variedad de procesos biológicos como son: la invasión y egreso del parásito al eritrocito, durante la lisis de la hemoglobina y en la invasión del hepatocito entre otros. Adicionalmente a estas proteasas citoplásmicas, recientemente se han identificado dos proteasas nucleares en *P. falciparum*: la calpaína, la cual tiene un impacto en la progresión del ciclo celular de la fase G1-S de este parásito y la dipeptidil aminopeptidasa 2 (DPAP2) quien realiza el procesamiento del extremo amino de la histona H3 en este parásito, y la forma procesada de la histona H3 se encuentra asociada a genes que regulan la replicación e invasión en *P. falciparum*. Por lo que con el propósito de identificar otras proteasas nucleares en *P. falciparum* e inferir su función se realizaron ensayos de zimografía en geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina, en los cuales se migraron extractos nucleares de este parásito obtenidos en ausencia de inhibidores de proteasas. De esta manera se evidenció que existen proteínas nucleares con la actividad de proteasas en *P. falciparum*, con un peso molecular que va desde los 52 a los 23 kDa. Además se demostró que la actividad proteolítica de estas proteasas nucleares es estadio-específica, observándose una mayor actividad proteolítica en el estadio de anillos. Por otro lado, al realizar ensayos de zimografía en presencia de inhibidores para las diferentes familias de proteasas, encontramos que la mayoría de las proteasas identificadas en nuestros ensayos pertenecen a la familia de las cisteín-serín proteasas. Análisis por espectrometría de masas de las proteasas presentes en los geles de zimografía nos permitieron identificar tres proteasas: una

metaloproteasa PfSPT16 (FACT-L), una aspártico proteasa (Plasmepsina II) y una cisteín proteasa (SERA 6). Un análisis *in silico* de los dominios que conforman a cada una de estas proteasas sugieren que al menos dos de ellas (PfPST16 y SERA 6), participan en modular la estructura de la cromatina durante la elongación de la transcripción al desensamblar a los nucleosomas, y de esta forma podrían participar en regular procesos biológicos importantes durante el ciclo intraeritrocítico de este parásito. La poca identidad que presenta PfSPT16 y SERA6 con proteasas presentes en el hospedero humano las convierte en excelentes candidatos para el diseño de una droga contra *P. falciparum*.

ABSTRACT

Malaria is a major global parasitic disease and cause of enormous mortality and morbidity. This disease is caused by protozoa parasite *Plasmodium*, and the highest mortality is produced by *P. falciparum*. In the search for new therapies to counteract this illness, proteases have emerged as possible target. Proteases are a group of enzymes that play essential roles in parasite growth and invasion. In this context, they are crucial for the pathogenic organisms both for their survival and the diseases they cause. Their potential as drug targets is underscored by the feasibility of designing specific inhibitors against them. Recently in *P. falciparum*, two nuclear proteases have been identified: calpain, which has an impact on the progression of the cell cycle of the G1-S phase of this parasite and dipeptidyl aminopeptidase 2 (DPAP2) which performs the processing of the amino terminus of histone H3 in this parasite. In order to identify other nuclear proteases in *P. falciparum* and inferring their functions, zymography assays were performed, on polyacrylamide gels co-polymerized with gelatin, in which nuclear extracts obtained in the absence of protease inhibitors of this parasite were migrated. We found that there are several nuclear proteins with proteases activity in *P. falciparum*, with a molecular weight from 52 to 23 kDa and are expressed in a stage-specific way mainly in the ring stage. We demonstrated that most of the nuclear proteases identified in our zymography assays belong to the family of cysteine serine-protease. Three proteases: a metalloprotease PfSPT16 (FACT-L), an aspartic protease (Plasmeprin II) and a cysteine protease (SERA 6) were identified by mass spectrometry of the proteases present in the zymography gels. An *in silico* analysis of the domains that contains each of these proteases suggest that at least two of them (PfPST16 and SERA 6), are involved in modulating the structure of chromatin during the elongation of transcription by disassembling nucleosomes. We propose that due to low identity of

PfSPT16 and SERA6 with proteases present in the human host makes them excellent candidates for a drug against *P. falciparum*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO DE LA MALARIA

La malaria es un problema de salud pública y la principal enfermedad parasitaria a nivel mundial incluyendo América Latina. Los parásitos protozoarios del género *Plasmodium* son el agente causal de la malaria o paludismo, una enfermedad que anualmente causa 445 mil muertes anualmente en todo el mundo y aproximadamente el 40% de la población mundial habita en áreas endémicas a malaria (91 países y territorios), (figura 1)^{1,2}.

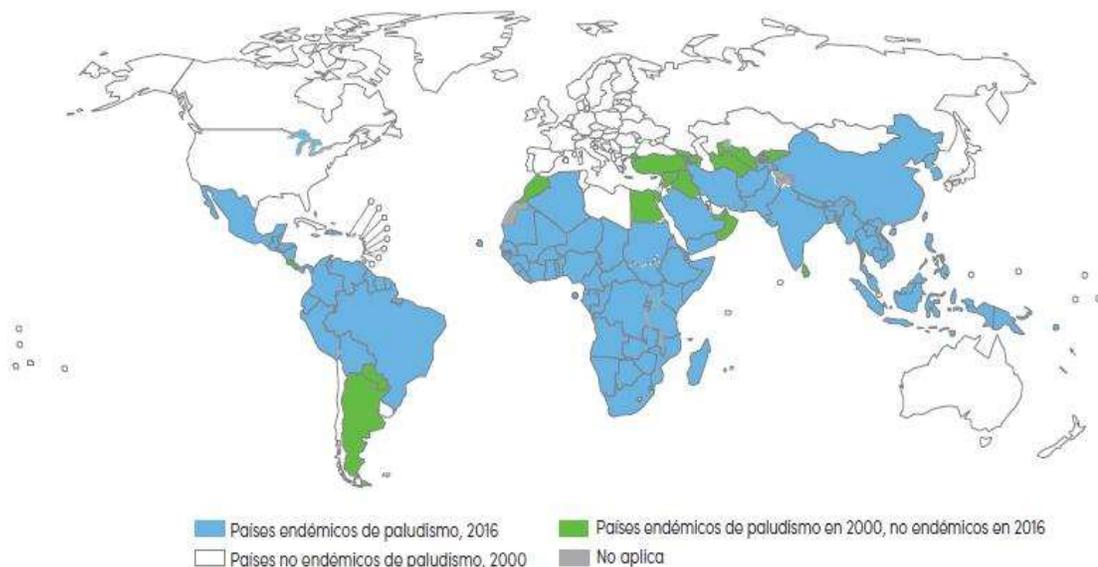


Figura 1. Distribución actual de la malaria a nivel mundial

Países endémicos de malaria en 2000 y 2016 (tomado de la base de datos de la OMS, 2016, http://www.searo.who.int/srilanka/areas/malaria/world_malaria_report_2016.pdf?ua=1).

En el 2016, los casos de malaria se registraron principalmente en el continente africano (90%), seguida de la región de Asia sudoriental (7%) y la región del Mediterráneo oriental (2%) y en todos los casos la inmensa mayoría de las muertes (99%) fueron debidas a *P. falciparum* siendo los niños, adultos no inmunes y mujeres embarazadas los más afectados³.

En lo que respecta al continente americano, actualmente la malaria es endémica en 21 países y territorios, entre los que se encuentran: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, el Salvador, Guayana Francesa, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, República Dominicana, Suriname y Venezuela^{4,5}.

Actualmente en México, la malaria se encuentra en la fase de pre-eliminación, aunque hay algunas zonas endémicas con transmisión intensa, como son: Chiapas, Campeche y Quintana Roo, en el sur del país; a lo largo de la frontera sur con Guatemala y Belice; Sinaloa, Sonora y Chihuahua a lo largo de la frontera norte y Nayarit, Durango y Jalisco en el centro del país. Sin embargo, en México desde el año 1982 no se han registrado defunciones por malaria asociado a *P. falciparum*⁶.

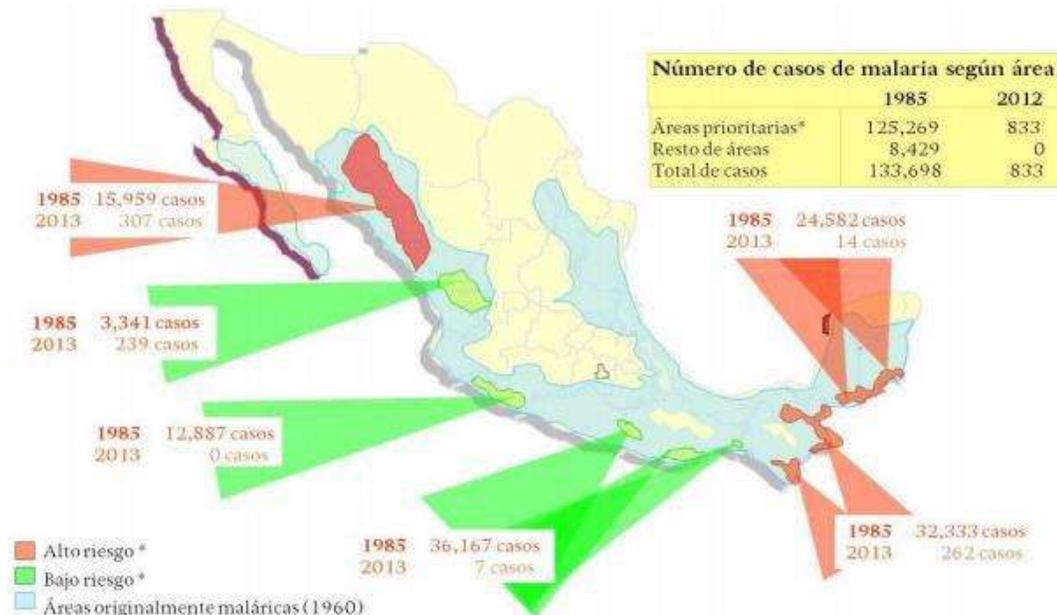


Figura 2. Áreas de riesgo de Malaria en México

Áreas de riesgo y número de casos de malaria en México (tomado de Secretaria de Salud. Prevención y control del Malaria, 2013, http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/38348/PAE_PrevencionControlPaludismo2013_2018.pdf).

Las especies de *Plasmodium* que infectan al humano son: *P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malarie*, y *P. falciparum* siendo esta última especie la responsable de producir la mayor mortalidad¹.

1.2 CICLO DE VIDA DE *P. falciparum*

El ciclo de vida de *P. falciparum* es complejo y este ocurre entre dos hospederos naturales: la hembra del mosquito del género *Anopheles*, en donde ocurre el ciclo sexual y el humano en donde se lleva a cabo el ciclo asexual con dos fases de desarrollo bien diferenciadas: la fase exoeritrocitaria (hepática) y la fase intraeritrocitaria⁷.

La infección causada por *P. falciparum* inicia cuando las formas móviles del parásito denominadas esporozoítos (15-123) las cuales se encuentran en la saliva de la hembra del mosquito *Anopheles* son inoculados en la dermis del humano a través de la picadura del mosquito⁸.

Estos esporozoítos viajan a través del torrente sanguíneo y llegan a los sinusoides hepáticos, donde forman una vacuola parasitófora: iniciándose aquí la fase exoeritrocitaria o hepática del parásito. Una vez en el hepatocito los esporozoítos maduran, se diferencian y sufren múltiples divisiones asexuales para generar esquizontes intrahepáticos, que formaran al menos 10,000 merozoítos. Estos merozoítos una vez liberados del hepatocito entran al flujo sanguíneo para invadir inmediatamente los eritrocitos iniciándose de esta forma el ciclo intraeritrocítico⁹.

Una vez que el merozoíto infecta al eritrocito sano, en su interior el parásito se diferencia en una forma joven conocida como anillo, crece y pasa a una forma intermedia denominada trofozoíto. Este consume el contenido de los glóbulos rojos y modifica la membrana celular del eritrocito que infecto, para facilitar la importación de nutrientes mediante la inserción de nuevas proteínas parasitarias y eliminar el producto potencialmente tóxico del hemo a través de su cristalización mediada por lípidos a hemozoina (pigmento de

la malaria) ¹⁰. Posteriormente este trofozoito se diferencia en una forma madura conocida como esquizonte, la cual se caracteriza por ser una célula multinucleada que dará origen de 16 a 32 merozoítos ¹¹.

Cuando los merozoítos están totalmente maduros salen del eritrocito infectado y ahora pueden invadir otros eritrocitos sanos e iniciar de nuevo la fase intraeritrocítica. Este proceso de crecimiento exponencial es responsable de todas las manifestaciones clínicas de la malaria y continúa hasta que el hospedero muere. Algunas veces, estos merozoítos al entrar al glóbulo rojo toman una ruta alterna y se diferencian ya sea a gametocitos femeninos o masculinos, proceso conocido como gametocitogenesis ¹².

Estos gametocitos son capaces de infectar al mosquito *Anopheles*, cuando este pique a un individuo infectado. Una vez en el intestino del mosquito los gametocitos continúan su desarrollo hasta diferenciarse en gametos, en seguida se lleva a cabo la fecundación originando un cigoto que se transforma en ooquineto ¹³, el cual es capaz de atravesar la pared intestinal del mosquito y ahora se diferencia a un ooquiste, en el interior del cual ocurren una gran cantidad de divisiones celulares que generan miles de esporozoítos, los cuales migran hacia las glándulas salivales del mosquito para terminar su maduración. Estos esporozoítos son inoculados al humano cuando el mosquito *Anopheles* infectado toma sangre de un individuo sano, iniciándose de esta manera el ciclo de vida ¹⁴. (Figura 3).

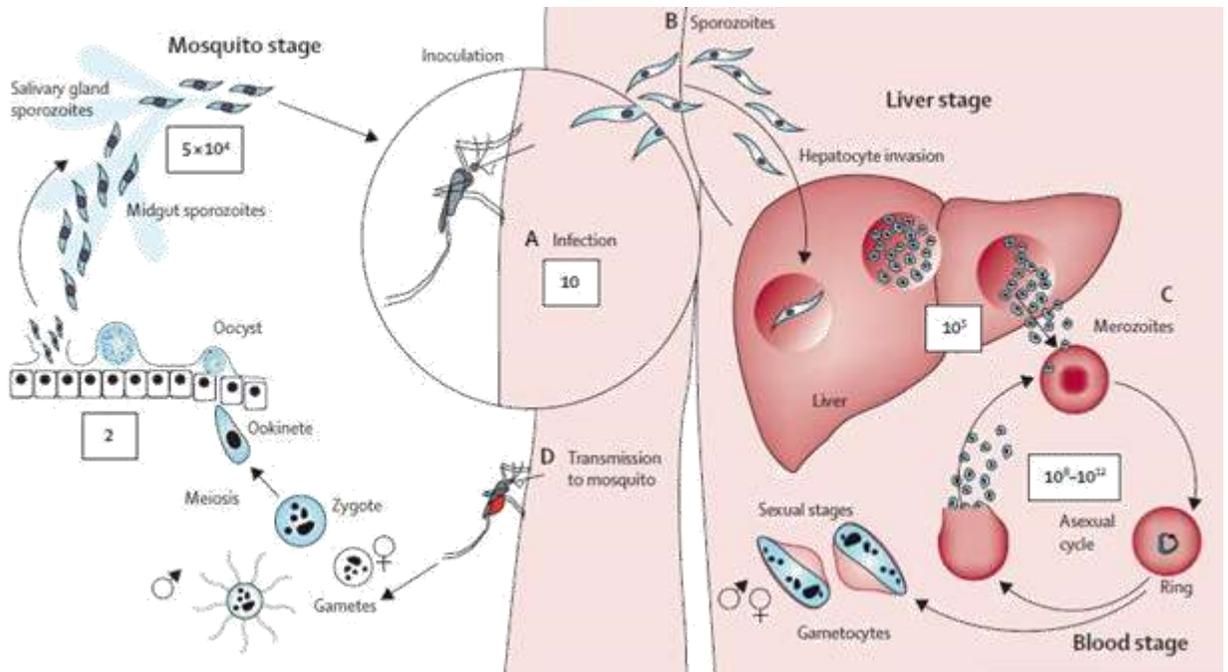


Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* El ciclo inicia con la inoculación de esporozoítos móviles a la dermis (A), los cuales viajan al hígado (B), cada esporozoíto invade al hepatocito y se multiplica. Después de una semana, los esquizontes se liberan del hígado y viajan a la circulación, donde invaden a los eritrocitos e inician el ciclo asexual (C). Algunos parásitos se desarrollan en formas sexuales (gametocitos), los cuales son tomados por un mosquito *Anopheles* (D) y se reproducen sexualmente, formando un oocineto y un oocisto en el intestino del mosquito. El oocisto estalla y libera los esporozoítos, los cuales emigran a las glándulas salivales y aguardan a que el mosquito nuevamente se alimente de sangre humana y los inocule en la dermis de su hospedero humano (Tomado de White J.N. et al., 2014).

1.3 GENERALIDADES DE LA MALARIA

1.3.1 Manifestaciones Clínicas

El período de incubación de la malaria varía de 8 a 40 días, pero en el caso de *P. falciparum* es de tan solo 8-9 días y durante este tiempo el paciente es asintomático¹⁵.

A partir del décimo día, se producen una serie de síntomas inespecíficos que duran entre 2 a 3 días como: fatiga, dolor de cabeza, artralgia, mialgia, dolor abdominal y torácico que simula cualquier enfermedad viral leve. Esto es seguido por el inicio de la fiebre que es la manifestación cardinal de la

malaria. La fiebre es a menudo alta, aumentando hasta 40°C en niños y personas no inmunes¹⁶.

El paroxismo clásico de la malaria consiste en fiebre con escalofríos y rigidez generalizada que ocurren a intervalos periódicos acompañados de dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, dolor de espalda, mialgia, palidez e ictericia¹⁷.

Este paroxismo es el resultado de la lisis de los glóbulos rojos parasitados y la liberación de merozoítos a la circulación al completarse la reproducción asexual. Aunque se piensa que la periodicidad del paroxismo en los ataques primarios es patognomónica para las especies de malaria, esta periodicidad puede tardar varios días en establecerse, no ocurrir en absoluto en las infecciones asíncronas o puede ser modificada por inmunidad o tratamiento previos. Las infecciones por *P. falciparum* suelen ser asíncronas, dando lugar a episodios febriles no periódicos, al menos durante los primeros días de la enfermedad¹⁸.

La infección por *P. falciparum* es la forma más grave de malaria, con tasas de letalidad de hasta 15% en niños no inmunes con anemia y dificultad respiratoria grave si no se instituye prontamente la terapia apropiada. Puesto que *P. falciparum* es la única especie de *Plasmodium* que infecta a eritrocitos de todas las edades esto puede conducir a una parasitemia intensa que puede alcanzar el 60% o más. Por lo tanto, las complicaciones graves de la malaria son más frecuentes en infecciones producidas por *P. falciparum*¹⁹.

1.3.2 Complicaciones

La infección por *P. falciparum* causa obstrucción en la microvasculatura debido a que los eritrocitos infectados (EI), se adhieren a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos de diferentes órganos. En consecuencia, se produce una isquemia, con hipoxia tisular, especialmente en el encéfalo, los riñones, los pulmones y el tubo digestivo, lo que puede conducir a anemia severa (la cual se caracteriza por niveles de

hemoglobina por debajo de los 50ng/L), malaria cerebral, insuficiencia renal aguda, hepatitis aguda de malaria, hipoglucemia, hiperpirexia, edema pulmonar no cardiogénico, síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto, síndrome de insuficiencia suprarrenal, hiperparasitemia, fiebre negra, arritmias cardíacas y síndromes gastrointestinales²⁰.

En la malaria causada por *P. falciparum*, se reportan frecuentemente alteraciones hematológicas progresivas como anemia severa, y trombocitopenia. En donde el grado de trombocitopenia está asociado con la gravedad de la infección. Entre las posibles causas de esta trombocitopenia se han postulado mecanismos autoinmunes, secuestro esplénico, coagulación intravascular diseminada (CID) y alteraciones de médula ósea. Un factor posiblemente involucrado, es la presencia de anticuerpos antiplaquetarios.²¹

La insuficiencia renal puede ser secundaria a la disminución del volumen sanguíneo debido a la obstrucción vascular de este órgano provocada por los eritrocitos parasitados o al depósito de complejos inmunitarios. La hemoglobinemia y la hemoglobinuria son producidas por la hemólisis intravascular y pueden progresar a fiebre de aguas negras (denominada de este modo a causa del color oscuro de la orina), ya sea espontáneamente o después del tratamiento con quinina. La hipoglucemia es frecuente y puede agravarse por el tratamiento con quinina²¹.

La malaria cerebral puede definirse como un coma provocado por una elevada parasitemia de *P. falciparum* en el cerebro (es decir, sin ninguna respuesta ante un estímulo doloroso) y se produce por la obstrucción de la microvasculatura cerebral debido a la adhesión de eritrocitos infectados al receptor ICAM-1, el cual se encuentra enriquecido en los microcapilares cerebrales ocasionando anoxia cerebral que conlleva a coma o muerte²⁰.

Por último, la Malaria congénita, la cual se transmite de una madre infectada a su feto. A menudo conduce a abortos, partos prematuros, retraso del crecimiento intrauterino (IUGR) y muertes neonatales. Los recién nacidos que sobreviven a esta enfermedad generalmente se vuelven sintomáticos en 10-30 días de vida presentado fiebre, letargo, palidez, ictericia y hepatoesplenomegalia²⁰.

1.3.3 Diagnóstico

La malaria generalmente se diagnostica examinando una muestra de sangre bajo un microscopio ya sea mediante frotis frescos de sangre teñidos con Wright-Giemsa o toma de gota gruesa que permiten evaluar la morfología del parásito dentro del eritrocito, identificar la especie, y determinar el porcentaje de parasitemia de manera más precisa. Para realizar esta prueba es preferible tomar la muestra durante un pico febril, ya que los parásitos jóvenes de *P. falciparum* (anillos), se encuentran en sangre periférica durante un tiempo después del paroxismo febril²². (Figura 4)

Otra prueba que también es empleada para el diagnóstico es la detección de antígeno por inmunocromatografía, esta prueba detecta una proteína rica en histidina 2 (HRP-2) y una lactato deshidrogenasa asociada con *Plasmodium* (PLDH). Esta prueba tiene mayor sensibilidad que las técnicas microscópicas pero son comparables en cuanto a sensibilidad ya que permite detectar niveles bajos de parasitemia. Sin embargo, este método no permite diferenciar si la infección es producida por una sola especie de *Plasmodium* (simple) o si se debe a una infección simultánea con más de una especie de *Plasmodium* y normalmente esta prueba identifica de manera específica las infecciones producidas por *P. falciparum*²³.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es otra prueba de diagnóstico, que permite detectar parasitemias muy bajas, y es muy útil en pacientes asintomáticos con alta sospecha de infección y se emplea cuando las dos pruebas anteriores han dado resultados negativos. Esta

técnica consiste en la amplificación de secuencias variables de la subunidad ribosomal pequeña 18S (rARN), con la cual es posible obtener un diagnóstico específico²⁴.

Finalmente el diagnóstico serológico, útil para el diagnóstico durante esplenomegalia hiperreactiva malarica, pero no en episodio agudos²⁴.

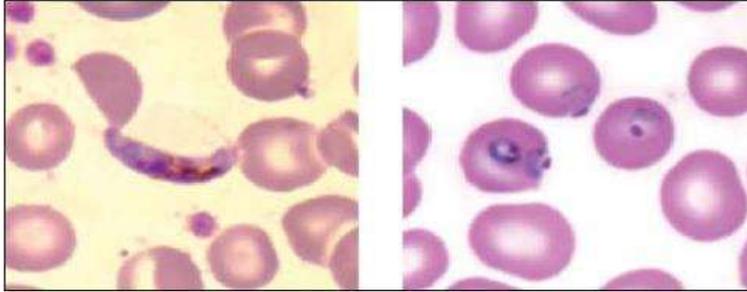


Figura 4. Frotis frescos de sangre periférica de pacientes infectados con *Plasmodium* teñidos con Wright-Giemsa. Tinción con Giemsa en donde se observan la fase sexual del parásito - gametocitos (izquierda) y glóbulos rojos parasitados por trofozoítos (derecha) (tomado de Pereira A. y Pérez M. 2002).

1.3.4 Tratamiento

El tratamiento para combatir la malaria ha evolucionado mucho: desde la histórica quinina a sus análogos de síntesis, con mención especial a la cloroquina; hasta las recientes artemisininas que, combinadas con otros fármacos de distintos orígenes y acciones farmacológicas, constituyen el tratamiento de elección (ACT o Terapia combinada con artemisininas)²⁵.

La mayoría de los antimaláricos actúan en la fase intraeritrocítica (sintomática) de la infección y una minoría tiene actividad en la fase exoeritrocítica o hepática (asintomática), pero no se conoce muy bien su comportamiento a este nivel. Por otro lado, la acción contra los gametocitos, toma importancia en la profilaxis terminal, o lo que es lo mismo, a la hora de bloquear la transmisión del humano al mosquito²⁶.

1.3.4.1 Fármacos antimaláricos

1.3.4.1.1 Derivados de quinolona

Todas estas drogas se acumulan en la vacuola parasitófora (VP) del parásito y forman un complejo con la ferriprotoporfirina IX (FPIX) que entorpece la biocristalización. Los derivados de quinolona han demostrado disminuir significativamente la concentración de hemozoina intraeritrocítica en estudios *in vitro*. Estos fármacos pueden interactuar con el grupo hemo de múltiples formas y los complejos fármaco-hemo inhiben la formación de hemozoina por distintas vías. Lo que entonces promueve la muerte del parásito en interior del EI²⁶.

Cloroquina

Esta droga es una 4-aminoquinolina, de utilidad en las especies que demuestran susceptibilidad como: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, y determinadas cepas de *P. vivax* y *P. falciparum* lo cual depende de la región geográfica²⁷.

La manera en que esta droga daña al parásito se debe a que la cloroquina al ser una base débil, difunde fácilmente hacia la VP, donde se protona doblemente y queda secuestrada. En el interior de la VP, su blanco es la FPIX a la que se une antagonizando la detoxificación del parásito, que termina por lisarse²⁷.

Además, varios estudios sugieren que la cloroquina también tiene otros blancos, como la inhibición de la glutatión peroxidasa, que es la enzima encargada de neutralizar los radicales libres generados por el grupo hemo en citosol²⁷.

Primaquina

Se trata de una 8-aminoquinolina con un espectro de acción especial. Actúa como esquizonticida hepático y gametocitocida hemático, en este caso, es el único que destruye a los gametocitos maduros de *P. falciparum*²⁸.

Otra particularidad de este fármaco es su acción frente a los hipnozoitos, la llamada “cura radical” de paludismos contra *Plasmodium vivax* y *ovale*²⁸.

Su mecanismo de acción no se conoce muy bien. Se cree que los intermediarios reactivos generados durante el tiempo que el parásito crece en el hepatocito producen daño celular a nivel de la mitocondria del *Plasmodium* en su sistema de transporte de electrones. La selectividad por los gametocitos se podría explicar por el daño que se produce en proteínas esenciales que participan en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el cual es de suma importancia en los estadios sexuales²⁸.

1.3.4.1.2 Antifolatos

El metabolismo de ácido fólico sirve como blanco contra la malaria, ya que este es imprescindible para la síntesis de bases pirimidínicas que constituyen el DNA y el RNA²⁵.

Sulfadoxina, pirimetamina y proguanil

Se desarrollan en combinaciones sinérgicas de inhibidores competitivos de la dihidrofolato reductasa (DHFR) [pirimetamina y biguanidas (proguanil)] e inhibidores de la dihidropteroato sintetasa (DHPS) [sulfonamidas (sulfadoxina)]. De tal manera que la combinación de ambos inhibidores bloquean a dos niveles la ruta biosintética de *novo* de folatos en *Plasmodium*²⁹.

Los antifolatos actúan principalmente contra los EI por esquizontes, ya que es en esta etapa cuando el parásito se divide. La pirimetamina y proguanil son antifolatos que se emplean principalmente, en la fase hepática. Sin

embargo, el parásito ha generado mutaciones en las enzimas blanco (dhps y dhfr) lo que ha conducido a que estos parásitos se hayan propagado rápidamente y a que el empleo de estas drogas sea muy limitado²⁹.

1.3.4.1.3 Artemisinina y sus derivados

El surgimiento de la artemisinina supuso un avance inmenso en la lucha mundial contra la malaria, además si tomamos en cuenta que el panorama contaba con un enemigo común: los parásitos de *P. falciparum* multirresistentes³⁰.

Las modificaciones estructurales realizadas para optimizar sus propiedades fisicoquímicas en base a la forma de administración dieron lugar a los derivados semisintéticos: dihidroartemisinina, artesunato (hidrosolubles) y arteméter (liposoluble), entre otros, los cuales son activos frente a todas las fases del ciclo asexual intraeritrocítico y gametocitocidas. Su estructura química de lactona sesquiterpénica alberga un puente endoperóxido responsable de la actividad, característico de este grupo farmacológico³⁰.

Las artemisininas como profármacos, precisan de una bioactivación para ejercer su acción y se piensa que estos fármacos se activan por una escisión reductiva de su anillo endoperóxido mediado por hierro (Fe^{+2}). En donde el grupo hemo actúa de activador y diana. Al igual que las quinolinas, las artemisininas inhiben la detoxificación en el parásito, en este caso, alquilando al grupo hemo lo que impide su dimerización a hematina y consecuente cristalización. En las primeras horas post-invasión (a las 2-4 horas), las artemisininas también muestran picos de actividad, lo que sugiere que existen vías alternativas de activación independientes de la hemoglobina, pudiendo tomar un papel más protagonista el Fe^{+2} libre³¹.

El principal problema del tratamiento con artemisininas es la eliminación incompleta del parásito en sangre, esto se debe a que su vida media es corta de tan solo 30 min a 2 horas y que su efecto en los EI por anillos es

reducido, de tal manera que si todavía quedan algunos El por anillos después de 2 horas cuando la droga ha perdido su efecto es muy probable que estos parásitos viables puedan continuar su desarrollo lo que conduciría a un recrudescimiento de esta parasitosis³². Por lo que si tomamos en cuenta que la artemisina tiene una vida media corta se descarta el empleo de una monoterapia a base de este medicamento y es por esto que se han propuesto las terapias combinadas basadas en artemisininas. La combinación de Dihidroartemisina-piperaquina es el tratamiento más estudiado³³.

El sinergismo entre un derivado de la artemisinina y otro fármaco activo antipalúdico con una vida media más larga resulta ser seguro y eficaz frente a la malaria, convirtiéndose así en el tratamiento de elección en malaria no complicada por *P. falciparum*, y para el resto de las especies de *Plasmodium*. Aun así, la emergente aparición de resistencia a artemisininas pone en riesgo su efectividad³³.

1.4 GENERALIDADES DE LAS PROTEASAS

El tratamiento de cualquier enfermedad infecciosa puede variar considerablemente con el paso de los años; muchos fármacos pierden utilidad por culpa de las resistencias. Actualmente las artemisininas tienen un papel principal en la terapia antimalárica, ya que han demostrado ser altamente eficaces. Sin embargo ni siquiera siendo prudentes con su uso (como parte de terapias combinadas) están exentas de perder su eficacia a largo tiempo. Por lo que siempre hay una necesidad de buscar nuevos medicamentos antipalúdicos porque nunca se sabe cuándo *P. falciparum* se volverá resistente³⁴.

En la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para contrarrestar a esta parasitosis, las proteasas han surgido como posibles blancos. Esto se debe

principalmente a que son una de las familias de enzimas que juegan un papel importante en una variedad de procesos de este parásito (mecanismos de invasión y egreso del eritrocitos, lisis de la hemoglobina, homeostasis proteica, son algunos de los ejemplos más estudiados). Además de que sus mecanismos de acción se encuentran bien caracterizados y se conoce la estructura de sus sitios activos³⁵.

Proteasa fue el primer término que se le dio a las enzimas proteolíticas y abarca a todas las hidrolasas que actúan sobre los enlaces peptídicos, es decir, las proteasas son capaces de catalizar la hidrolisis de los enlaces peptídicos de las proteínas³⁶.

Una de las características más importantes de las proteasas es su alta especificidad. El hecho de que un enlace peptídico sea hidrolizado o no por una proteasa depende de varios factores, entre ellos, la secuencia de aminoácidos alrededor del enlace, ya que la mayoría reconocen aminoácidos o secuencias específicas. Otro requisito para que tenga lugar la hidrolisis es la accesibilidad estérica del enlace, de manera que si este se encuentra en zonas hidrofóbicas poco accesibles no podrá ser atacado por la proteasa a menos que se produzca un cambio conformacional de la proteína que aumente su accesibilidad. Por último, se han de considerar las condiciones físico-químicas del medio, dado que las proteasas presentan un rendimiento óptimo a unas determinadas condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de factores orgánicos y/o metálicos³⁷.

La mayoría de las proteasas se traducen como un zimógeno inactivo, es decir, un precursor enzimático inactivo que no cataliza ninguna reacción y que para activarse necesita de un cambio bioquímico en su estructura como lo es la eliminación de ciertos dominios que le permitan conformar un centro activo donde pueda realizar la catálisis³⁸.

Para que ocurra la activación de este zimógeno se requiere de la ruptura catalítica de uno o más enlaces peptídicos, lo cual acontece de forma irreversible, ya que no existen reacciones opuestas que regeneren el

mismo enlace peptídico hidrolizado o que reinserten el péptido liberado correspondiente³⁹.

La activación de zimógenos por ruptura proteolítica de uno o varios enlaces peptídicos es un proceso enzimático que requiere la presencia de una enzima activante y generalmente esa enzima activante es distinta del zimógeno inactivo aunque a veces el propio zimógeno puede tener una reacción de autocatálisis y activarse a sí misma³⁹.

Además la activación de las proteasas, puede estar regulado por otros mecanismos como pueden ser la unión de co-factores, modificaciones postraduccionales y cambios en su localización subcelular³⁹.

1.4.1 Clasificación de las proteasas

Según la ubicación de los enlaces hidrolizados, las proteasas a su vez se dividen en dos grandes grupos: las endopeptidasas: que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína y las exopeptidasas: que remueven uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino⁴⁰.

Además, en 1967, Schechter & Berger, propusieron un modelo conceptual para referirse a la especificidad de una proteasa. En este modelo se consideran los residuos de aminoácido del sustrato (P) que se unen a subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se numeran a partir del enlace a ser escindido hacia el N-terminal como P1, P2, P3, etc., en tanto que los que se encuentran hacia el C-terminal se denominan P1', P2', P3', etc. Los subsitios de la proteasa que “acomodan” los residuos del sustrato se numeran como S1, S2, S3 y S1', S2', S3', respectivamente, (figura 5)⁴¹.

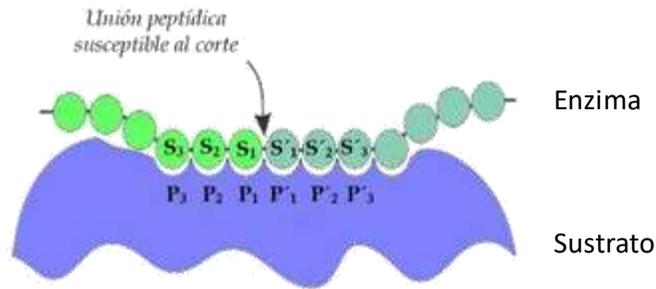


Figura 5. Interacción enzima-sustrato. Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitios del sitio activo de una peptidasa, (tomado de Introducción al mundo de las proteasas, disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2249/Introducción al mundo de las proteasas.pdf?sequence=5](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2249/Introducción%20al%20mundo%20de%20las%20proteasas.pdf?sequence=5)).

Por otro lado, en 1993, Barret y Rawlings describieron una clasificación de las proteasas basada en las características de sus mecanismos catalíticos, su secuencia y sus grupos estructurales, siendo hasta ahora la más utilizada. De este modo, podemos encontrar serín proteasas, cisteín proteasas, aspártico proteasas, metalo proteasas y treonin proteasas⁴².

En 1996 surge la base de datos de proteasas MEROPS donde se encuentran más de dos mil peptidasas con número de identificación y cerca de 2500 secuencias. Este sistema de clasificación tiene en cuenta los siguientes conceptos:

1. Clan: Conjunto de familias en las que todas las proteasas han evolucionado a partir de un ancestro único.
2. Familia: Incluye proteasas que presentan homología en la secuencia aminoacídica de la región encargada de la actividad enzimática. Cada familia de proteasas es nombrada con una letra que denota el tipo catalítico (S - serina, T- treonina, C - cisteína, A - aspartato y M - metalo) seguida de un número arbitrario; las proteasas cuyo mecanismo catalítico se desconoce se agrupan en la familia U.
3. Peptidasas o Proteasas: Grupo de proteínas que muestran una actividad proteolítica particular y que están muy estrechamente relacionadas en secuencia⁴³.

Clasificación de las proteasas por su mecanismo catalítico

El concepto de tipo catalítico de una proteasa depende de la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis y como se mencionó anteriormente se pueden encontrar serín proteasas, cisteín proteasas, aspártico proteasas, metalo proteasas y treonin proteasas, las cuales serán descritas a continuación⁴².

Serín proteasas, poseen diferentes especificidades de sustrato; algunas de estas serín proteasas tienen un amplio sitio de interacción con el sustrato, mientras que otras tienen una especificidad restringida al residuo P1 del sustrato. La actividad de estas proteasas suele ser máxima a valores de pH alcalinos y no requieren activadores. Su mecanismo catalítico consiste en una fase de acilación en la que se forma un intermediario covalente acil-enzima y una fase de desacilación en la que una molécula de agua rompe el intermediario⁴⁴.

Todas estas enzimas tienen un centro activo formado por tres aminoácidos absolutamente conservados, serina, histidina y aspartato, conjunto que recibe el nombre de tríada catalítica y es el centro activo de la enzima en donde se une el sustrato. El grupo de las serina proteasas es muy amplio, se distinguen siete clanes de proteasas serínicas al comparar las estructuras terciarias y el orden de los residuos catalíticos en las secuencias. Pertenecen a este grupo las familias de las proteasas similares a tripsina, a elastasa, a quimotripsina y las subtilisinas⁴⁴.

Cisteín proteasas, estas contienen una diada catalítica conformada por un residuo de cisteína y un residuo de histidina. La cisteína realiza un ataque nucleofílico para iniciar la hidrólisis del enlace peptídico, el nucleófilo en este caso no es un grupo -OH sino un ion tiolato, razón por la cual también reciben el nombre de tiol proteasas⁴⁵.

Son proteasas cisteínicas la papaína, la quimopapaína, la bromelina, la cruzipaina, las caspasas, las catepsinas lisosomales de mamíferos, las

calpaínas citosólicas y varias endopeptidasas virales. Este tipo de enzimas manifiestan su actividad a pH variable según el tipo de enzima y de sustrato. Así, las ubicadas en los lisosomas actúan generalmente a pH ácido, en tanto que la papaína tiene actividad en un amplio rango de pH y las calpaínas son activas a pH superiores a 7,5⁴⁵.

Aspártico proteasa, Son todas endopeptidasas y se caracterizan por actuar en forma óptima a un pH en el rango ácido, razón por la cual también se conocen como proteasas ácidas, y este aspecto limita la función de estas proteasas a algunas ubicaciones específicas. Su mecanismo catalítico involucra residuos de ácido aspártico en el sitio activo de la cadena peptídica, unidos a una molécula de agua que es la que actúa como nucleófilo. Dado que no existen grupos funcionales de estas enzimas que provoquen un ataque nucleofílico sobre el carbonilo de la unión peptídica a escindir, no hay intermediario covalente entre la enzima y el sustrato. La mayoría de las proteasas aspárticas estudiadas pertenecen a la familia de la pepsina y todos los miembros de la familia de A1 de la pepsina han sido hallados en eucariotas. Esta familia incluye a enzimas del tracto digestivo, como la pepsina, gastricsina y quimosina, enzimas lisosomales como la catepsina D y E, a la renina producida en el riñón además de algunas proteasas fúngicas. Una segunda familia incluye proteínas virales tales como la proteasa del VIH, llamada retropepsina⁴⁶.

Treonin proteasas, Son todas endopeptidasas, en las que el nucleófilo puede ser serina, treonina o cisteína. Estas proteasas tienen una treonina N-terminal conservada en cada sitio activo y son activadas mediante aminas primarias. Además estas proteasas son responsables del funcionamiento del proteosoma (complejo multiproteico de degradación de proteínas) y algunas de estas proteasas tienen el único propósito de activarse a sí mismas⁴⁷.

Metalo proteasas, son proteasas en las cuales el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado por una molécula de agua, en las que un ion metálico divalente actúa como catalizador en el péptido al que se une para realizar la hidrólisis, usualmente este ion es el zinc, aunque algunas veces puede ser cobalto, níquel o manganeso. En general, los iones metálicos están unidos en una conformación tetraédrica en el sitio activo, es decir, tres ligandos de aminoácidos (generalmente histidina, glutamina, aspártico o lisina), se asocian con el ion metal junto con una molécula de agua que se usa para la hidrólisis. Estas proteasas se dividen en dos grandes grupos dependiendo del número de iones metálicos requeridos para la catálisis, es decir en varias metalo proteasas solamente se requiere de un ion zinc, pero en otras son dos iones metálicos que actúan cocatalíticamente. Todas aquellas en las que son esenciales cobalto o manganeso se requieren de dos iones metálicos y estas son exopeptidasas, mientras que aquellas con ion metálico catalítico pueden ser exo o endopeptidasas. Dentro de estas metalo proteasas en base a su homología estructural y de secuencia podemos encontrar a 54 familias diferentes, en donde destacan las termolisinas, las carboxipeptidasas, las colagenasas y las astacinas⁴⁸.

1.4.2 Inhibidores de proteasas

La función de las proteasas ha sido estudiada gracias a la identificación de inhibidores específicos para cada tipo de proteasas. Un inhibidor de proteasa se entiende como aquel compuesto o molécula capaz de interferir con la actividad proteolítica de la proteasa en cuestión⁴⁹.

Este efecto inhibitorio puede ocurrir a través de dos mecanismos: 1) que el inhibidor impida la entrada del sustrato al sitio activo de la enzima y 2) por impedir que la enzima catalice su reacción correspondiente⁵⁰.

A su vez la unión del inhibidor puede ser reversible o irreversible. Normalmente, los inhibidores irreversibles reaccionan con la enzima de forma covalente y modifican su estructura química a nivel de los

aminoácidos necesarios para la actividad enzimática⁴⁸. En cambio, los inhibidores reversibles se unen a la enzima de forma no covalente, dando lugar a diferentes tipos de inhibiciones, dependiendo de si el inhibidor se une a la enzima, al complejo enzima-sustrato o a ambos⁵⁰.

Comercialmente existe un amplia gama de inhibidores (Tabla I), en este apartado se describirán aquellos que fueron empleados durante este proyecto⁵¹.

Tabla I. Inhibidores de proteasas comerciales. Panel de inhibidores para serín, cisteín, metalo, treonin y aspártico proteasas, (<https://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>)

Reagents

Protease Inhibitor	Catalog Number	Package Size	Storage Temp	Working Range	Molecular Weight	Stock Solution Solubility
AEBSF	A8456	25 mg	-20 °C	0.1–1 mM	239.7	50 mg/mL (water)
6-Aminohexanoic acid	A2504	25 g	RT	5 mg/mL	131.2	25 mg/mL (water)
Antipain	A6191	5 mg	-20 °C	1–100 µM	604.7	50 mg/mL (water)
Aprotinin	A1153	5 mg	2–8 °C	10–800 nM	6512	10 mg/mL (water)
Benzamidine HCl	B6506	5 g	2–8 °C	0.5–4 mM	156.6	50 mg/mL (water)
Bestatin	B8385	5 mg	-20 °C	40 µM	344.8	25 mg/mL (water)
Chymostatin	C7268	5 mg	-20 °C	6–60 µg/mL (10–100 µM)	~608	6 mg/mL (DMSO)
E-64	E3132	5 mg	2–8 °C	10 µM	357.4	20 mg/mL (water)
EDTA disodium salt	ED2SS	50 g	RT	1 mM	372.2	50 mg/mL (water)
N-Ethylmaleimide	E3876	5 g	2–8 °C	0.1–1 mM	125.1	50 mg/mL (ethanol)
Leupeptin	L2884	5 mg	-20 °C	10–100 µM	475.6	50 mg/mL (water)
Pepstatin	P5318	5 mg	2–8 °C	0.5–1.0 µg/mL	685.9	1 mg/mL (ethanol)
Phosphoramidon	R7385	5 mg	-20 °C	10 µM	543.5 (free acid)	10 mg/mL (water)
Trypsin inhibitor	T9003	100 mg	-20 °C	1:1 stoichiometric binding	20,100	10 mg/mL (water)

AEBSF: Inhibidor irreversible de serín proteasas especialmente aquellas con especificidad a residuos básicos P1, (figura 5). Este inhibidor es un agente sulfonilante (floruro de sulfonilo), que actúa al reaccionar con el grupo hidroxilo del residuo de serina del sitio activo para formar un derivado de la enzima sulfonilo. Este inhibidor es altamente estable durante largos períodos de tiempo, excepto a un pH alto⁵².

E-64: Inhibidor específico e irreversible de cisteín proteasas, especialmente aquellas tipo papaína y calpaína. Posee un grupo de ácido trans-epoxisuccinilo. Este epóxido modifica irreversiblemente el sitio activo de

cisteína, produciendo un ataque nucleofílico del grupo tiol, que conlleva a la formación de un enlace tioéter. Una característica importante del E-64 y otros inhibidores epóxidos es que no reaccionan con tioles de bajo peso molecular, como ditioneitol⁵³.

EDTA: Inhibidor de metaloproteasas. Tiene la propiedad de quelar iones metálicos, es muy eficaz para eliminar Calcio, Magnesio, Molibdeno, Hierro, Cobre y Zinc, iones que puede sustraer de los compuestos químicos de los que formen parte. Por ejemplo, este compuesto químico inhibe la reacción de hidrólisis secuencial de enlaces peptídicos de proteínas a partir del extremo carboxilo terminal (C-terminal), mediado por la carboxipeptidasa A, quelando el ion Zinc que contiene esta enzima en su centro activo, es decir, el EDTA inhibe la actividad catalítica de estos iones situados en los centros activos de diferentes enzimas⁵⁴.

Pepstatina A: Inhibidor de bajo peso molecular específico para proteasas ácidas (aspártico proteasas). Es un hexapéptido natural que contiene el aminoácido inusual estatina (ácido Sta, (3S, 4S) -4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico) y para que este inhibidor pueda llevar a cabo su efecto, deben de estar presentes tres elementos: un grupo 3 (S)-hidroxilo en el tercer residuo de pepstatina, un grupo isopropilo o su equivalente en el primer residuo y una porción de grupo dipeptil Ala-Sta en C-terminal.

Pepstatina se une al sitio activo de la proteasa aspártica, donde su grupo hidroxilo puede verse como un enlace de hidrógeno con uno de los ácidos aspárticos imitando el estado de transición tetraédrico de la reacción (hidrólisis de la amida)⁵⁵.

1.5 PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEASAS EN EL CICLO INTRAERITROCÍTICO DE *P. falciparum*

Tomando en cuenta la urgente necesidad de encontrar nuevos blancos terapéuticos contra la malaria, las proteasas han surgido como moléculas muy prometedoras. Actualmente se sabe que en el genoma de *P. falciparum* existen alrededor de 149 proteasas probables. Sin embargo, solo se ha estudiado un tercio de estas proteasas y entre ellas muy pocas han sido completamente caracterizadas³⁵.

Entre las más estudiadas se encuentran las que actúan en las etapas del ciclo intraeritrocítico ya que es esta fase del ciclo de vida del parásito responsable de producir las formas más graves de la enfermedad y en donde se producen las manifestaciones clínicas. Por lo que estas han sido objeto de estudio y algunas de ellas son consideradas como candidatos para producir fármacos o drogas que bloqueen la actividad de la proteasa³⁵.

A continuación se describirá que proteasas se han caracterizado y en que etapas del ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum* participan.

1.5.1 Mecanismo de Invasión de los eritrocitos

Uno de los procesos más estudiados y en los que sea establecido claramente el papel que tienen las proteasas en este parásito es en la invasión del merozoíto. Mecanismo que puede dividirse en tres fases características, la primera es una interacción inicial del merozoíto con el eritrocito provocando una deformidad en la membrana del eritrocito; la segunda consiste en entrada del parásito al eritrocito sano y, la tercera consiste en el sellamiento de la membrana plasmática del eritrocito infectado (EI)⁵⁶ (Figura 6).

La interacción inicial entre el eritrocito y el merozoíto es de baja afinidad y es mediada por las proteínas de la superficie del merozoíto (MSPs 1-9). Posteriormente el merozoíto se reorienta de forma que su parte apical (parte del merozoíto en donde se ubican los orgánulos secretores roptrias y micronemas, figura 6) queda en contacto con la superficie del eritrocito, en este punto el merozoíto parece interactuar con el eritrocito de forma irreversible. Esta interacción se encuentra mediada por familias de adhesinas ubicadas en los micronemas de los merozoítos y las cuales son liberadas tras la señalización intercelular. Estas proteínas se conocen como EBL (*erythrocyte-binding-like*) y Rh o RBL (*reticulocyte-binding-like*), las cuales se unen a través de diversos receptores como CR1, GPA, GPB y GPC presentes en la superficie del eritrocito. En este momento se forma la unión estrecha, y el complejo AMA1 (antígeno apical de membrana 1) /RON2 (proteína de las roptrias 2) se insertan en la membrana del eritrocito y sirve como estímulo para que el merozoíto propulsado por su motor de actino-miosina se mueva hacia el interior del eritrocito, lo que le permite ingresar desde el polo apical a el polo posterior del eritrocito. Al mismo tiempo que el parasito entra al eritrocito, invagina la membrana del eritrocito que constituirá a la vacuola parasitófora (figura 6). Una vez que el merozoíto penetra hasta su polo posterior, las adhesinas se eliminan proteolíticamente facilitando el sellamiento de la membrana del eritrocito⁵⁶.

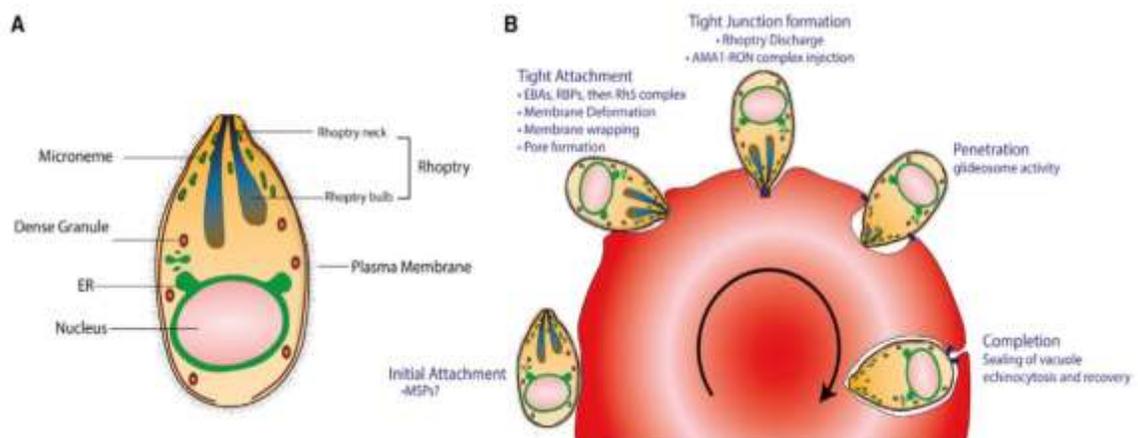


Figura 6. Estructura del merozoíto y fases del mecanismo de invasión. A) Estructura subcelular de un merozoíto de *P. falciparum*, donde se observa que los

orgánulos como roptrias y micronemas se localizan en su parte apical. **B)** Invasión del merozoíto al eritrocito. La invasión involucra una interacción inicial, que tal vez involucre a las MPS, luego existe una reorientación apical del merozoíto lo que provoca una deformación en la membrana del eritrocito. Se sugiere que se forma un poro entre el merozoíto y el eritrocito en donde se encuentra involucrado directa o indirectamente el complejo PfRh5/PfRipr/CyRPA, este se encuentra asociado con el movimiento del complejo RON a la membrana del hospedero. Posteriormente se forma una unión estrecha la cual involucra interacciones de alta afinidad ligando-receptor entre AMA1 en la superficie del merozoíto y RON2 insertado en la membrana del eritrocito, esta unión estrecha permite el movimiento del merozoíto. Una vez alcanzado el polo posterior del eritrocito, las adhesinas son removidas proteolíticamente, para permitir el sellamiento de la membrana de la célula huésped y el parásito inicia su vida en el interior del EI. (Tomado de Cowman, *et al.*, 2017).

Durante cada uno de los pasos que involucra la invasión, las proteasas no solo tienen un papel activo (figura 7), sino que también aseguran la maduración apropiada de los merozoítos antes de que escapen del EI³⁵.

Durante la primera fase de la invasión (interacción del merozoíto con el eritrocito) se ha visto que la proteasa SUB2 (subtilisina 2), la cual es secretada a partir de los micronemas del merozoíto, lleva a cabo el procesamiento de las proteínas de la superficie del merozoíto 1, 6 y 7 (MSP 1/6/7), (figura 7A)⁵⁷.

Mientras que en la segunda fase de la invasión (entrada del merozoíto al eritrocito sano), SUB2 procesa a AMA1 (antígeno apical de membrana 1) y PTRAMP (proteína apical del merozoíto tipo trombospondina de *Plasmodium*) la cual, participa en el movimiento del citoesqueleto del parásito durante la invasión. En este punto también se requiere a PfROM1, localizada en el extremo apical de los merozoítos y la cual es capaz de escindir a AMA. Esta proteasa *in vitro* se ha demostrado es necesaria para formar uniones estrechas y permitir que el merozoíto penetre eficientemente al eritrocito⁵⁸.

Además existen otras proteasas que participan en esta fase, como SUB1 (subtilisina 1) que se ha demostrado escinde varias proteínas de las roptrias que son importantes para la invasión como RAP1 (proteína asociada a las roptrias 1), RhopH3 (proteína de las roptrias de alto peso molecular 3) y RAMA (antígeno de membrana asociado a las roptrias). Asimismo proteasas romboidales del parásito son

liberadas durante esta fase. Para que durante la última fase, estas proteasas realicen la escisión de diferentes familias de adhesinas transmembrana, (figura 7B) ⁵⁹.

Finalmente en la tercera fase, PfROM4 localizada en la superficie del parásito, se ha demostrado que escinde el dominio transmembranal de las adhesinas (importantes para la unión del parásito a la superficie de los eritrocitos). En particular, se ha comprobado que PfROM4 fragmenta a EBA175 (adhesina importante para la vía de invasión dependiente de ácido siálico), (Figura 7C). Igualmente proteasas romboidales procesan otras adhesinas permitiendo así el sellamiento de la membrana del EI y la permanencia del merozoíto en el interior del eritrocito en donde el parásito iniciará su diferenciación (figura 7D) ⁶⁰.

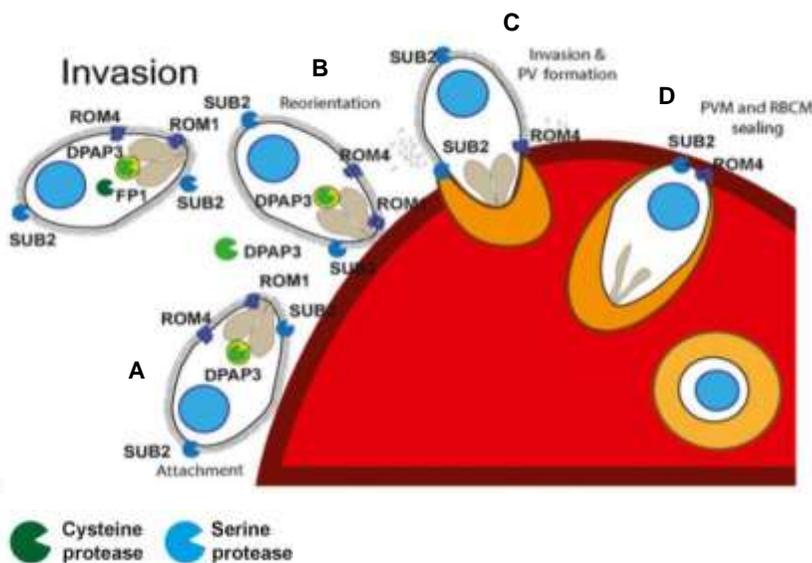


Figura 7. El rol de las proteasas durante el proceso de invasión del eritrocito. (Tomado de E. Deu, 2017).

1.5.2 Proceso de degradación de la hemoglobina

Una vez que el merozoíto ha ingresado al eritrocito este genera una nueva identidad biológica conocida como eritrocito infectado (EI). Para que *P. falciparum* pueda crecer dentro del eritrocito, durante su etapa más joven

(anillo) el parásito se alimentara inicialmente de la hemoglobina presente en el EI y en este punto participan una serie de proteasas. A esta vía se le conoce como la ruta de degradación de hemoglobina³⁵.

La hemoglobina es el componente principal de los eritrocitos y su degradación ocurre principalmente dentro de la vacuola parasitófora, este orgánulo es una estructura ácida con un pH estimado de 5.0 a 5.4. Este pH se mantiene mediante un gradiente de protones activado por una bomba de ATPasa. Mientras que el parásito crece y se desarrolla, la cantidad de degradación de la hemoglobina aumenta pero no la cantidad de proteína del parásito: aunque los parásitos de la malaria digieren más del 65% de la hemoglobina de la célula huésped, solo utilizan aproximadamente el 16% de esta digestión para sintetizar proteínas para sus necesidades propias⁶¹.

La degradación de la hemoglobina es realizada por 4 clases de enzimas en el parásito, las aspártico proteasas (Plasmepsinas I-IV), las cisteín proteasas (Falcipaínas 2, 3 y 20), la metalo proteasa (Falcilisina) y finalmente una Dipeptidilpeptidasa (DPAP1)⁶².

La primera fase de la degradación de la hemoglobina es llevada a cabo por las plasmepsinas I-IV, las falcipaínas 2, 3 y 20, las cuales tienen como sustrato las cadenas α y de la globina. Durante la segunda fase de la degradación de la hemoglobina, la falcilisina convierte los polipéptidos de globina corta en oligopéptidos que consisten en 5 a 10 aminoácidos. Todas estas proteasas se han aislado de la vacuola parasitófora, y funcionan óptimamente a un pH de alrededor de 5, coincidiendo con la acidez de la vacuola parasitófora. Asimismo se ha demostrado que la plasmepsina I, plasmepsina II y la falcipaína 2, se encuentran formando parte de un complejo multiproteico junto con la proteasa histaspártico y una proteína llamada HDP (*Hemedetoxification protein*) las cuales no solo se necesitan para la degradación de la hemoglobina sino también para la síntesis de la hemozoina⁶².

Se conoce también, que las proteasas plasmepsina I y plasmepsina II necesitan ser activadas proteolíticamente por las falcipainas para iniciar el proceso de degradación de la hemoglobina, ya que la inhibición de falcipaina conduce a la acumulación de hemoglobina no digerida en la vacuola parasitófora, lo que da como resultado un ensanchamiento de este orgánulo⁶².

Finalmente, en esta ruta de degradación de la hemoglobina, se encuentran otras proteasas participando activamente, una de ellas es la DPAP1, la cual degrada los oligopéptidos de la globina producidos por la proteasa falcilisina a dipéptidos y por último las aminopeptidasas citosólicas (PfAM1, PfA-M17, Pf-APP, PfA-M18) las cuales catalizan la liberación de aminoácidos de los dipéptidos y oligopéptidos producidos a partir de la α y globina⁶³.

1.5.3 Mecanismo de egreso de los eritrocitos

Una vez que el merozoíto ha alcanzado su maduración dentro del eritrocito este debe lisar la membrana de la vacuola parasitófora y la membrana del EI para ser liberado al torrente sanguíneo mecanismo conocido como egreso. Este paso es esencial para que el parásito promueva su propagación y continúe su ciclo de vida³⁵.

Antes de la salida del merozoíto se requiere de una desestabilización del citoesqueleto del eritrocito basado en las proteínas de actina y de espectrina. Esta desestabilización inicia con la fosforilación de la actina lo que provoca la disociación de la banda 3 del esqueleto submembranal del eritrocito. Además también en el EI, ocurre una pérdida de proteínas adaptadoras del citoesqueleto como son; el heterotetrámero α/β -adducina (el cuál en condiciones normales estabiliza la asociación entre actina y espectrina, y funciona como puente entre el complejo de unión espectrina-actina-banda 3) y la tropomiosina (la cual normalmente se une a la actina y eleva la estabilidad mecánica de la membrana del eritrocito), lo que conduce a una inestabilidad de la membrana y fragmentación espontánea

del EI. Además tanto la falcipaina-2 (cisteín proteasa) y plasmepsina II (aspártico proteasa) provenientes del parásito, degradan a la ankirina y espectrina del eritrocito, lo que conduce a la inestabilidad de la membrana del EI⁶⁴.

Además, SUB1, que es una proteasa secretada por el parásito hacia la vacuola parasitófora (Figura 8-2), escinde proteínas específicas de la vacuola parasitófora, como MSRP2 (proteína relacionada con la proteína de superficie del merozoíto 2) y activa a las proteínas del complejo SERA (antígeno repetido de serina) PfSERA4, PfSERA5, PfSERA6 lo que resulta en la ruptura de la vacuola parasitófora y posteriormente la ruptura de la membrana del eritrocito infectado. Por lo que se ha considerado que las proteínas SERA son importantes para la salida del merozoíto del EI, (figura 8-4)⁶⁵.

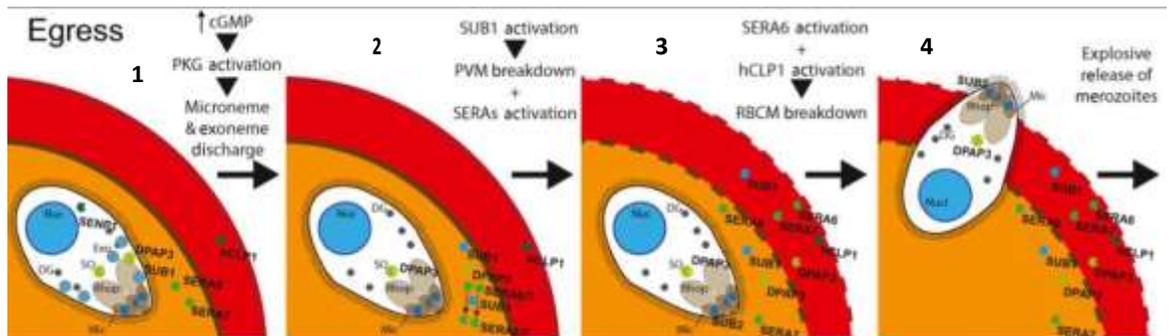


Figura 8. El rol de las proteasas durante el mecanismo de egreso del eritrocito. 1) Un aumento en los niveles de cGMP activa la proteína cGpC citosólica, que desencadena la secreción de proteínas de los orgánulos apicales del merozoíto a la vacuola parasitófora (VP). 2) SUB1 es secretada y comienza a degradar la VP además también procesa otras proteínas, entre ellas se encuentra a la familia SERA y de esta manera las activa. 3) La proteasa calpaína 1 de humano es activada y se cree realiza el procesamiento de los componentes del citoesqueleto de la célula huésped. 4) Finalmente, las proteínas SERA degradan a la membrana del EI, permitiendo la salida del merozoíto al torrente sanguíneo para que infecte a otros eritrocitos sanos. (Tomado de E. Deu, 2017).

1.5.4 Sistema de degradación de proteínas

La homeostasis de proteínas es importante en este parásito dado su complejo ciclo de vida y la variedad de etapas morfológicas por las que atraviesa. En donde en cada una de ellas, requiere de un conjunto

particular de proteínas. Por lo que es probable que un recambio y proteólisis de proteínas sea necesaria cada vez que el parásito se diferencia; lo que requerirá la degradación oportuna de las proteínas mal plegadas y de las que no son específicas de estadio y por lo tanto ya no son esenciales para su desarrollo³⁵.

La gran mayoría de las proteínas se procesan al menos dos veces: primero mediante la eliminación de su metionina amino-terminal por Met-aminopeptidasas (MetAP); en este parásito se han identificado hasta la fecha cinco MetAP y se ha demostrado que inhibidores de MetAP1b y MetAP2 tienen actividad antiparasitaria⁶⁶.

En segundo lugar a través de su degradación por un sistema proteolítico dependiente de ATP (proteosoma) o en orgánulos lisosomales⁶⁷.

La ruta principal de degradación de proteínas en eucariotas se lleva a cabo por el proteosoma 26S además de otros complejos proteolíticos cuya actividad está regulada por chaperonas AAA ATPasa (como el proteosoma 20S, el proteosoma HsIV y las proteasas Clp). Estas chaperonas reconocen los sustratos, despliegan y enhebran el sustrato en el núcleo proteolítico de manera dependiente de ATP y activan alostéricamente la apertura de la compuerta en el canal donde los sustratos son procesados proteolíticamente⁶⁸.

P. falciparum posee un proteosoma 26S, un homólogo de proteosoma HsIV y un homólogo de proteasas Clp. El proteosoma 26S de este parásito es un complejo multiproteico en forma de barril, el cual está compuesto por una partícula reguladora 19S (RP) y una partícula central 20S (CP). Las cuales se expresan a lo largo de su ciclo de vida. Las subunidades del RP 19S reconocen y despliegan sustratos de degradación mientras que el CP 20S es responsable de la escisión proteolítica⁶⁸.

Además del proteosoma eucariótico, se han identificado en este parásito homólogos de la subunidad catalítica de la proteasa procariota caseínica Q (ClpQ) también conocida como locus V de choque térmico (HsIV) y su

chaperona reguladora ClpY/HsIV. Ambas se expresan durante las etapas de trofozoíto, esquizonte y merozoíto y tienen una localización mitocondrial. Por lo que esta proteasa puede ser responsable de degradar proteínas en la mitocondria. PfClpQ presenta actividades semejantes a proteasas de treonina tipo caspasa y quimotripsina y su actividad se mejora después de la activación por su chaperona PfClpY, formando un complejo a través de su dominio carboxilo-terminal, (figura 9)⁶⁹.

También se han identificado en *P. falciparum* homólogos para la proteasa ClpP y su chaperona ClpC, que se expresan durante las etapas de trofozoíto y esquizonte temprano. Este complejo complementa la maquinaria de degradación de proteínas presentes en el citosol y las mitocondrias. Se ha demostrado que PfClpP posee una actividad de serina proteasa tipo quimotripsina y que es activada por PfClpC. Además de que este complejo se encuentra en el apicoplasto del parásito. Orgánulo que en *P. falciparum*, es responsable de la biosíntesis de ácidos grasos e isoprenoides, esencial en el ciclo intraeritrocítico de este parásito⁷⁰.

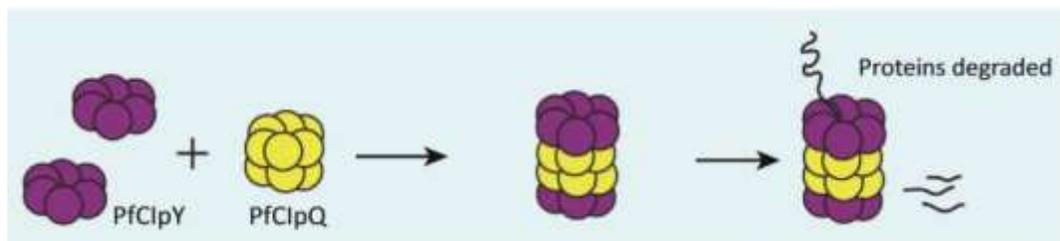


Figura 9. Representación esquemática de PfClpY/PfClpQ – PfClpC/PfClpP. Ensamble del complejo chaperona (PfClpY o PfClpC) y proteasa (PfClpQ o PfClpP) permitiendo la escisión proteolítica regulada de los sustratos de degradación (Tomado de Ng. C, et al., 2017).

Por lo que entonces y de acuerdo a los antecedentes antes descritos queda claro que las proteasas que ha sido caracterizadas y validadas principalmente son aquellas que se encuentran en el citoplasma y poco se conoce de las proteasas nucleares de este parásito. Las cuales muy probablemente existan ya que se ha demostrado que en organismos

eucariotas las proteasas nucleares juegan un papel importante en diversos procesos biológicos que permiten su supervivencia.

1.6 PROTEASAS NUCLEARES EN OTROS EUCARIOTAS

El núcleo en células eucariotas ocupa el 10% del volumen total de la célula y está constituido por una envoltura nuclear, el nucléolo, los poros nucleares y los cromosomas. Dentro de las funciones que se le atribuyen al núcleo se encuentran: la organización cromosómica, el mantenimiento del ADN, la replicación y el control de la expresión génica⁷¹.

El DNA eucarionte se encuentra altamente empaquetado para caber en un espacio tan pequeño como es el núcleo. Por lo que, la formación de la cromatina es característica de los eucariotas y permite que el genoma se empaquete jerárquicamente para que se adapte al espacio nuclear. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma el cual se encuentra conformado por las histonas H2A, H2B, H3 y H4, todas ellas son proteínas altamente básicas. Estas histonas se encuentran en pares para formar el octámero de histonas el cual interacciona con 146 pares de bases de ADN. A través del extremo carboxilo terminal (C-terminal) las histonas están interaccionan entre sí y con el DNA; mientras que el extremo amino terminal (N-terminal) de estas histonas sobresale fuera del nucleosoma, lo que las hace accesibles a sufrir diferentes modificaciones postraduccionales (PTMs). Las PTMs más estudiadas son al menos 8: la acetilación, la metilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación, la ADP-ribosilación, la deiminación y la isomerización de prolina. Estas modificaciones en las histonas son dinámicas y cambian rápidamente en respuesta a estímulos celulares. La combinación de estas PTMs regulan procesos fundamentales que incluyen la replicación, la reparación y la

transcripción del DNA. Por lo que, la desregulación de estas modificaciones de histonas se ha correlacionado con una variedad de enfermedades humanas.⁶⁹ En este punto, se ha propuesto que proteasas presentes en el núcleo podrían desempeñar un papel en la eliminación de las PTM de los extremos de las histonas a través de proteólisis (tabla 2), lo cual afectará a varios procesos celulares (figura 10)⁷².

Tabla II. Lista de las histonas procesadas y del organismos en donde ocurre este evento (Tomado y modificado de Azad G. et al., 2014)

Tipo de Histona - Proteasa	Origen
H3 proteasa Glutamato deshidrogenasa	Pollo
H3 proteasa Catepsina L	Ratón
H3 proteasa	<i>Tetrahymena</i>
H3 proteasa	Virus
H3 proteasa	Levadura
H2A proteasa	Timo de ternera
H2A proteasa	Pollo
H1-like proteasa	<i>Tetrahymena</i>

La primera vez que se explicó este procesamiento fue en la cromatina de ratas. Posteriormente se encontró que en *Tetrahymena* la escisión proteolítica de la histona H4 (que forma parte del *core* nucleosomal) era necesaria para su desarrollo macronuclear⁷².

Además, este procesamiento proteolítico de las histonas ha sido descrito en la histona H1, H2A y H3. Por lo que a continuación describiremos quién y cómo se lleva a cabo este procesamiento en las histonas.

1.6.1 Procesamiento proteolítico de la histona H1

El micronúcleo de *Tetrahymena* contiene tres formas de la histona H1 denominados *alfa*, *beta* y *gamma*, los cuales derivan del corte proteolítico de la histona H1. Se ha sugerido que este procesamiento proteolítico puede formar parte de la vía de diferenciación de nuevos micronúcleos y que desempeña un papel importante en la generación de diversidad de histonas en los micronúcleos de *Tetrahymena*. Esto probablemente tenga profundas consecuencias sobre la estructura y función de la cromatina del

micronúcleo, al modular la composición de la histona H1 que va a conformar a la cromatina⁷³.

Más tarde a partir de la cromatina hepática de rata, se purificó parcialmente a una proteasa neutra denominada proteasa B, la cual degrada de forma eficiente a la histona H1 cuando se asocia al DNA, pero no degrada a las histonas que forman parte del core nucleosomal⁷⁴.

Otro organismo en donde se ha observado el procesamiento proteolítico de la histona H1 es en *Chlamydia trachomatis*, quien posee homólogos de proteínas tipo histona H1, denominadas Hc1 y Hc2, las cuales parecen participar activamente en el ciclo de desarrollo de estas bacterias; se encontró que Hc1 es procesada en su extremo C-terminal, por una proteasa codificada por el gen EUO. Por lo que tomando en cuenta que la histona H1 está involucrada en la formación de una estructura de cromatina de orden superior (fibra 30 nm), se cree que posiblemente esta proteasa se encuentre participando en regular la estructura de la cromatina⁷⁵.

Sin embargo, el procesamiento de las histonas no solamente ocurre en la histona H1 sino también en la histona H2A y H3, por lo que a continuación describiremos un poco acerca de que proteasa realiza el procesamiento y la posible función de la histona procesada.

1.6.2 Procesamiento proteolítico de la histona H2A

En el año de 1976, Eickbush TH y colaboradores, encontraron que en la cromatina de timo de ternera se detectó el procesamiento proteolítico de la histona H2A, originando una forma nueva denominada H2A corta (cH2A). La histona cH2A es procesada en su extremo carboxilo terminal y la proteasa que lleva a cabo esta actividad, se encuentra estrechamente asociada con la cromatina *in vivo*. Además, se encontró que esta cH2A es capaz de formar un dímero con la histona H2B, por lo que la eliminación de esta forma corta de la histona H2A da como resultado una marcada

disociación del octámero de histonas. Por lo que entonces, se sugiere que H2A tiene una función importante en el mantenimiento de la asociación de las subunidades del octámero de histona⁷⁶.

Recientemente, se ha observado que existe un mecanismo similar de procesamiento proteolítico en la histona H2A en extractos nucleares de hígado de pollo, el cual es llevado a cabo por una aspártico proteasa denominada H2Asp, la cual tiene una expresión tejido específico y este procesamiento se lleva a cabo entre los aminoácidos 90 y 91 de H2A. Sin embargo, se propone que esta forma procesada de la histona H2A debe tener alguna función, la cual falta por conocer⁷⁷.

1.6.3 Procesamiento proteolítico de la Histona H3

Brand y Von Holt revelaron que en el polen de *Cycadidae* existía el corte proteolítico en las histonas H3 (entre la lisina 23 y la alanina 24) y de la histona H4 en su extremo N-terminal, sugiriendo que este corte podría proporcionar un mecanismo que permite regular la expresión génica⁷⁸.

En virus, específicamente en las células infectadas por el virus de la fiebre aftosa (FMDV), se observó la ausencia de la histona H3 y la aparición simultánea de una nueva proteína asociada a la cromatina denominada Pi. Esta proteína Pi, mediante secuenciación se encontró que deriva de la histona H3 por escisión proteolítica de los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal los cuales son procesados de manera temprana y específica durante la infección. Este procesamiento es llevado a cabo por una proteasa viral denominada 3C. Debido a que la histona H3 trunca sigue asociada a la cromatina se cree sea un requisito para reprimir la transcripción de la célula huésped durante la infección viral como ya ha sido reportado para varios picornavirus⁷⁹.

En el erizo de mar, se ha reportado la existencia del procesamiento de las histonas espermáticas durante la remodelación de la cromatina post-fertilización. Este proceso es llevado a cabo por una Catepsina L,

denominada SpHp. Su inhibición impide la replicación del ADN y la progresión hacia la mitosis. Curiosamente, esta cisteín-proteasa colocaliza con la cromatina durante la fase S, migra al huso mitótico en la fase M y se reubica en los núcleos de las células hijas después de la citocinesis. Por lo tanto, después de haber asegurado la proteólisis de las histonas espermáticas en la fertilización que contribuye a la remodelación de la cromatina masculina, SpHp continúa desempeñando un papel durante el desarrollo, alterando el ciclo celular durante las divisiones y controlando linajes celulares más específicos durante la gastrulación⁸⁰.

En células madre embrionarias de ratón (ESC) se reportó que la histona H3 es procesada en su extremo N-terminal y que este evento es dependiente del progreso de la diferenciación de estas células. Se encontró que esta escisión la realiza una catepsina L entre los aminoácidos alanina 21 y treonina 22. Además demostraron que este procesamiento se encuentra regulado por PTMs presentes en el extremo amino de esta histona, en donde la acetilación de residuos de lisina (K23, K18) en la histona H3 reduce el procesamiento, mientras que la dimetilación en la lisina 27 (H3K27me2) incrementa este procesamiento⁸¹.

Más recientemente, en *Saccharomyces cerevisiae* se describió el procesamiento de la histona H3 por una endopeptidasa, la cual realiza el procesamiento después de la Alanina 21, generando una histona que carece de los primeros 21 residuos. Este procesamiento se encuentra regulado por PTMs presentes en el N-terminal de la histona, ya que se encontró que cuando existe la metilación de la lisina 4 en la histona H3 este corte no se lleva a cabo. Asimismo, la pérdida del extremo N-terminal es un evento temprano que conduce a la inducción de la expresión de genes implicados en la esporulación⁸².

Más tarde, otro estudio proporcionó evidencia del procesamiento proteolítico tejido específico de la histona H3 en núcleos de hígado de pollo, el cual es llevado a cabo por una glutamato deshidrogenasa (GDH), esta

proteasa corta a la histona H3 tanto en su forma libre como cuando forma parte de los nucleosomas que constituyen a la cromatina. El procesamiento de la histona H3 por GDH genera una histona H3 procesada que carece de los 23 aminoácidos del extremo N-terminal y puede tener el potencial de regular las PTM de la histona H3 mediante la eliminación de los residuos N-terminales de la histona⁸³.

Finalmente, usando modelos de senescencia inducida por oncogenes en fibroblastos, se determinó que ocurre el procesamiento del extremo N-terminal de la histona H3. Este procesamiento es realizado por una catepsina L denominada CTSL1. Esta forma procesada de la Histona H3 reprime la expresión de genes regulados por E2F, el cual activa la transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular, a través de la eliminación de la trimetilación de la lisina 4 de la Histona H3 (H3K4me3). Dato que fue corroborado mediante secuenciación masiva del RNA (RNA-seq) de fibroblastos en crecimiento vs fibroblastos senescentes. Además, está eliminación de H3K4me3 a través de la proteólisis de histonas puede contribuir a la represión a largo plazo de los genes promotores de la proliferación y, por lo tanto, a la naturaleza irreversible de la proliferación celular que conduce a la senescencia⁸⁴.

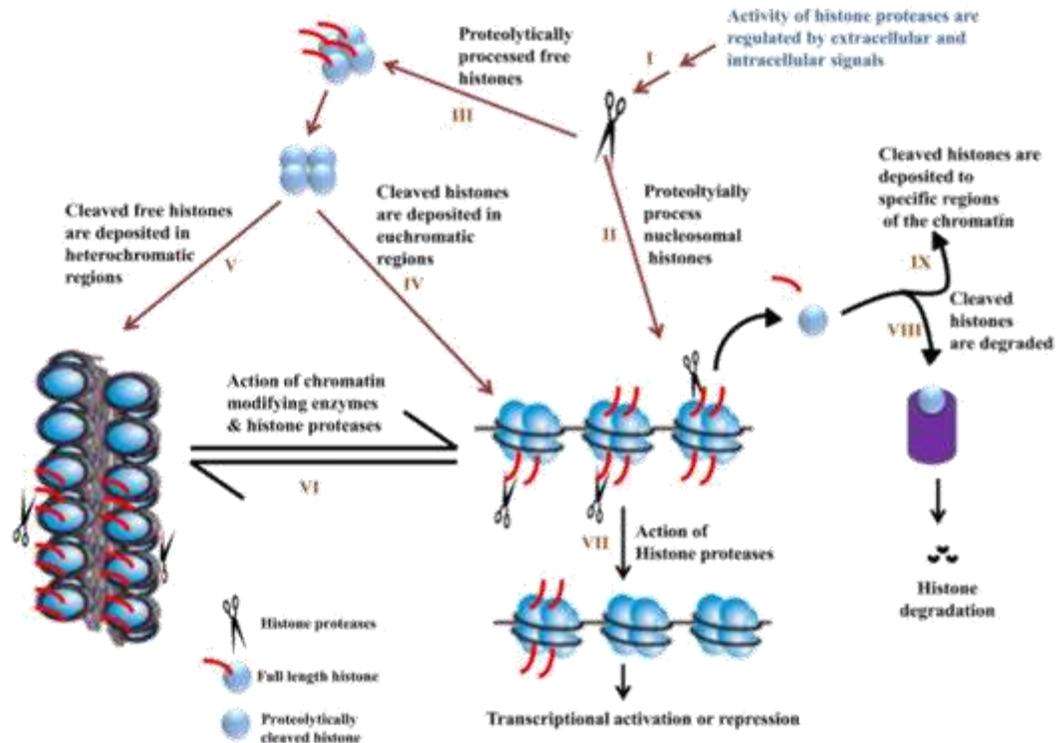


Figura 10. Modelo propuesto del papel de la proteólisis de las histonas en la regulación de la estructura y función de la cromatina. Se propone que diversos estímulos propician la actividad de estas proteasas sobre las histonas (I). Después de su activación, estas proteasas pueden procesar tanto a la histona asociada a la cromatina (II) como las histonas libres (III). Se cree que las histonas libres procesadas pueden depositarse en cualquiera de las regiones eucromáticas (IV) o heterocromáticas (V). Se propone que estas proteasas nucleares podrían estar involucradas en regular la dinámica de la cromatina para inducir la formación de heterocromatina o eucromatina (VI). El papel de estas proteasas se ha implicado tanto en la activación como en la represión de los genes (VII). Se sugiere que la histona procesada podría eliminarse del nucleosoma y seleccionarse para degradación (VIII) o reciclarse para ensamblarse en regiones específicas de la cromatina (IX). (Tomado de Azad K. y Tomar S., 2014).

1.6.4 Procesamiento proteolítico en otros componentes nucleares

Sin embargo, el procesamiento proteolítico de las histonas no es la única actividad proteolítica que ocurre en el núcleo, también se ha demostrado que existen proteasas que tienen otros sustratos en el núcleo de células eucariotas y cuyos ejemplos describiremos a continuación.

Se ha demostrado que en fibroblastos, existe una isoforma corta de cisteín proteasa perteneciente a la subfamilia de la catepsina L, la cual es capaz de traslocarse al núcleo y de esta forma procesar proteolíticamente al factor de transcripción CDP/Cux, generando una isoforma capaz de establecer una interacción estable con el DNA y participar en distintas funciones reguladoras. Este producto, denominado p110 es capaz de acelerar la transición de G1 a S. Por lo tanto, es probable que el procesamiento proteolítico de CDP/Cux represente un paso regulatorio importante en el inicio de la fase S⁸⁵.

Por otro lado, en rinovirus humano, se reveló la existencia de la proteasa HRV2A, la cual es capaz de procesar a Nup62 (una nucleoporina) en seis sitios diferentes, lo que permite un aumento en la permeabilidad de la envoltura nuclear y la relocalización de proteínas nucleares al citoplasma⁸⁶.

A continuación describiremos algunas proteasas que han sido identificadas en el núcleo de este parásito.

1.7 PROTEASAS NUCLEARES EN *P. falciparum*

El genoma de *P. falciparum* está constituido por 22.8Mb organizadas en 14 cromosomas cuyos tamaños oscilan entre 0.7 a 3.4Mb, cada cromosoma contiene una región central bien conservada y regiones terminales altamente polimórficas⁸⁷.

De manera similar a todos los organismo eucariotas, el genoma de *P. falciparum* empaqueta sus cromosomas en nucleosomas, en donde alrededor de 155 pares de bases se encuentran alrededor de este octámero de histonas y debido a que carece de la histona H1 se dice que tiene un empaquetamiento más relajado, lo que podría sugerir que *P. falciparum* presenta una eucromatina transcripcionalmente activa que persiste durante todo el estadio intraeritrocítico⁸⁸.

En *P. falciparum*, mediante análisis de espectrometría de masas se comprobó la presencia de cuatro histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4) y cuatro variantes (H2A.Z, H2Bv, H3.3 y CenH3). Además mediante ensayos de WB utilizando anticuerpos contra diferentes modificaciones postraduccionales así como ensayos de espectrometría de masas realizado en las histonas de *P. falciparum* han permitido demostrar que los extremos N- terminales de estas histonas presentan diferentes PTMs. Por otro lado ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) han demostrado que estas PTMs son dinámicas y cambian en respuesta a diferentes estímulos celulares. Como lo hemos descrito anteriormente estas PTM regulan procesos fundamentales que incluyen la replicación, reparación y transcripción de genes. Y estas pueden ser blanco de proteasas eliminando estas PTM de los extremos de las histonas, lo cual podría afectar varios procesos celulares fundamentales para este parásito⁸⁸.

Sin embargo, se carecía de información acerca de proteasas que pudieran existir en el núcleo de este parásito.

No fue sino hasta el año 2009 que el grupo del Dr. Goldberg, describió a la primera proteasa nuclear en este parásito. La cual es una cisteín-proteasa perteneciente a la familia de las calpaínas. Esta proteasa se encuentra en diferentes organismos y muestran una gran divergencia de secuencia y estructura de dominios, pero tienen dominios catalíticos homólogos, (figura 11). Las calpaínas han sido implicadas en diversos procesos como señalización celular, migración, muerte celular, regulación del ciclo celular, diferenciación y desarrollo, aunque el papel fisiológico preciso de estas calpaínas aún no se conoce bien⁸⁹.

Estas proteasas se pueden dividir en calpaínas típicas (que se asemejan a calpaína 1) y atípicas (carentes de dominio IV). En las calpaínas típicas, el domino IV media la unión con Ca^{2+} y en consecuencia, la regulación de la actividad y la dimerización⁸⁹.

En *P. falciparum*, se encontró que existe solo un gen que codifica para calpaína (Pcalp) y esta proteasa, es una calpaína atípica ya que carece del dominio IV (figura 11). Además se descubrió que esta calpaína posee varios subdominios altamente conservados en especies de alveolados y le confieren singularidad a esta proteasa, (figura 11). Uno de estos subdominios permite su localización nuclear, lo cual fue corroborado mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopia electrónica encontrándose que esta proteasa tiene una localización nucleolar. Esta calpaína es esencial para el crecimiento del parásito y tiene una expresión desde el estadio de anillos a trofozoítos tardíos. Finalmente, para conocer la función de esta proteasa *in vivo*, se realizó el *knock-down* condicional de esta, utilizando el sistema de dominio de desestabilización FKBP. En donde el dominio FKBP se fusiona a la proteína de interés y lo dirige a la degradación, sin embargo en presencia del ligando de FKBP, una molécula pequeña llamada Shld1, que evita la degradación de la proteína⁸⁹.

El *knock-down* de Pcalp produjo un defecto en el crecimiento de los parásitos de un 40-60% en dos ciclos intraeritrocíticos. Morfológicamente, se observó un retraso en la transición de la etapa de anillo a trofozoíto. Asimismo, se encontró que tiene un impacto en la progresión del ciclo celular de la fase G1-S⁸⁹.

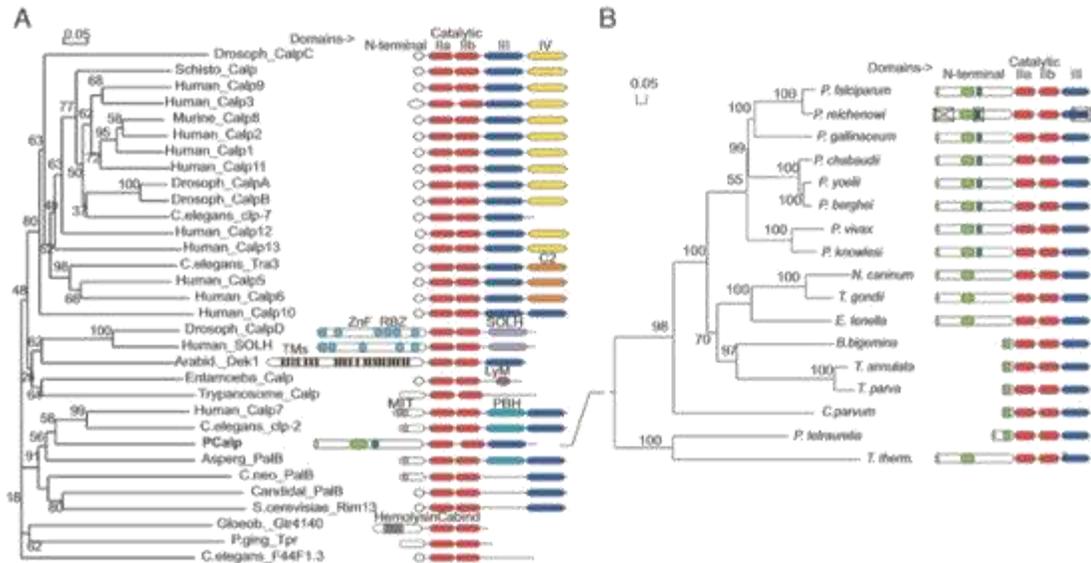


Figura 11. Árbol filogenético de las calpaínas. A) Análisis filogenético de las calpaínas (domino catalítico) alineado con los dominios que componen a las calpaínas de diferentes especies. B) Análisis filogenético y composición de los dominios de calpaínas en alveolados (Tomado de Russo I., *et al.*, 2009).

Más recientemente en nuestro laboratorio, Herrera-Solorio en su trabajo de doctorado describió el procesamiento de la histona H3 por una proteasa nuclear⁹⁰.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron por primera vez que el extremo NH₂-terminal de la histona H3 de *P. falciparum* es procesado durante el ciclo intraeritrocítico principalmente en estadio esquizonte. Ensayos de Western Blot y espectrometría de masas (MS) de la histona H3 procesada determinaron que el procesamiento ocurre entre los aminoácidos 22 y 23 de esta histona. Mientras que ensayos de actividad *in vitro*, así como el uso de inhibidores para diferentes familias de proteasas establecieron que es una catepsina C quién podría ser la responsable de realizar dicho procesamiento. Mediante análisis *in silico*, en la base de datos del genoma de este parásito, se encontró un gen que codifica para una probable catepsina C perteneciente a la familia de las dipeptidil aminopeptidasa denominada DPAP2⁹⁰.

DPAP2 se determinó que se expresa principalmente durante la etapa de esquizonte y posee una secuencia de localización nuclear sugiriendo que esta proteasa podría ser la responsable del procesamiento proteolítico de la histona H3 en el núcleo⁹⁰. Esto se corroboró realizando el *knock-down* de DPAP2, encontrándose que cuando esta proteasa no está presente, el procesamiento de la histona H3 no se lleva a cabo, por lo que entonces el procesamiento de la histona H3 en este parásito es realizado por la proteasa DPAP2. Finalmente mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina acoplado a secuenciación masiva (*ChIP-Seq*) mostraron que la histona H3 procesada, se encuentra enriquecida en genes implicados en la replicación e invasión de este parásito⁹⁰. Por lo que entonces surge la pregunta, ¿Existen otras proteasas nucleares que se encuentren regulando de manera indirecta procesos biológicos en este parásito?

2. JUSTIFICACIÓN

Los parásitos protozoarios contienen una amplia variedad de proteasas. Estas forman los principales factores de virulencia en diversas enfermedades parasitarias tales como la esquistosomiasis, la malaria, la leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño africana. Algunos ejemplos bien caracterizados de las funciones de las proteasas en la patogénesis de *P. falciparum* incluyen su participación en la invasión y salida de las células huésped, la degradación de la hemoglobina y la homeostasis proteica. En este contexto, son cruciales para el organismo patógeno tanto para su supervivencia como para la enfermedad que causa. En *P. falciparum*, al menos se han identificado dos proteasas nucleares y en una de ellas al menos se ha demostrado que participa en regular la expresión de genes implicados en la replicación e invasión. Por lo que entonces sería muy interesante averiguar si existen otras proteasas nucleares que sean importantes para el ciclo intraeritrocítico de este parásito.

3. HIPÓTESIS

P. falciparum cuenta con diferentes proteasas nucleares, las cuales regulan diversos procesos biológicos durante su ciclo intraeritrocítico.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar e identificar la existencia de otras proteasas nucleares en *P. falciparum* y conocer si éstas se expresan de manera estadio-específico durante el ciclo intraeritrocítico del parásito.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la presencia de proteasas nucleares *in silico*.
2. Demostrar la existencia de proteasas nucleares en *P. falciparum* de manera experimental.
3. Establecer si estas proteasas nucleares se expresan de manera estadio-específico.
4. Determinar qué clase de proteasas nucleares existen en este parásito.
5. Identificar al menos una de ellas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo *Plasmodium falciparum* cepa 3D7

La cepa 3D7 de *P. falciparum*, se cultivó por infectar eritrocitos humanos tipo A+ al 5% de hematocrito en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con bicarbonato de sodio (2 g/L), D-glucosa (2 g/L), hipoxantina (110 mg/mL), gentamicina (80 ng/mL) complementado con Albumax (invitrogen) a una concentración final de 5%. Cada botella de cultivo se gaseó con una mezcla de gases que contiene: 96% N₂, 3% de CO₂ y 1% de O₂ durante 30 segundos para generar un ambiente anaerobio. Posteriormente los parásitos se mantuvieron a 37°C y el medio se cambió cada tercer día. Para monitorear la parasitemia, se tomó una alícuota de 200 µl de sangre parasitada y se realizó un frotis el cual se tiñó con Giemsa (60% agua bidestilada más 40% Giemsa) y se observó al microscopio óptico. Trager W, Jensen JB. (1976).

6.2 Sincronización de los parásitos 3D7 de *P. falciparum* con sorbitol

Los cultivos de los parásitos de la cepa 3D7 se sincronizaron utilizando Sorbitol de acuerdo a la técnica reportada por Lambros y Vanderberg, (1979). Brevemente, un cultivo asincrónico (mayormente en estadio de anillo), se recuperó en tubos cónicos y se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, por cada ml de botón de glóbulos rojos parasitados (GRP) se agregaron 10 ml de sorbitol al 5% (precalentado a 37°C). Esta mezcla se incubó a 37°C en baño maría durante 10 minutos con agitación cada 2 minutos. Esto provocó la lisis de los glóbulos rojos parasitados en estadio esquizontes y trofozoítos, una vez que finalizó el tiempo de incubación la mezcla se centrifugó a 2,500 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. La pastilla con los GRP en estadio de anillo, se resuspendió en medio RPMI completo y nuevamente se incubó a 37°C.

Este procedimiento se repitió cada 36 horas para mantener sincronizado el cultivo.

6.3 Lisis por saponina

Con el fin de liberar a los parásitos de los EI se realizó una lisis con saponina de acuerdo al protocolo descrito por Wallach, D.F. *et al.*, (1982). Brevemente, se tomaron 4 ml de glóbulos rojos parasitados a los que se les agregó 4 ml de saponina al 0.75% y 12 ml de PBS 1X estéril (NaCl 0.13M, KCL 2.6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM). Esta mezcla se homogenizó e incubó durante 15 minutos a 37°C, con la finalidad de romper la membrana de los eritrocitos. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y la pastilla (la cual contiene a los parásitos), se resuspendió en PBS 1X frío y se transfirió a tubos eppendorf. La muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto, y este procedimiento se realizó varias veces hasta que el sobrenadante ya no contenía trazas de hemoglobina. Una vez realizado lo anterior, los parásitos se usaron inmediatamente o se guardaron a -80°C hasta su uso.

6.4 Extractos Nucleares

Para obtener los extractos nucleares se utilizó el protocolo descrito por Lanzer M. *et al.*, (1993). Al botón de parásitos presentes en el tubo eppendorf, se le agregó 1 ml de buffer hipotónico (10 mM Hepes pH 7.9, 0.1 mM EDTA pH 8, 0.1 mM EGTA), más NP-40 a una concentración final de 0.25% (para desestabilizar la membrana y facilitar la lisis) y se mantuvo a 4°C durante 30 minutos. La lisis de los parásitos se efectuó de forma mecánica con ayuda de un homogeneizador, en donde se aplicaron 200 golpes con pausas de 1 minuto cada 50 golpes. La liberación de los núcleos se monitoreó al microscopio y una vez que se liberaron al menos el 90% de los núcleos, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante que contenía a las **proteínas citoplásmicas**. Mientras que el botón (los núcleos y *debris*) se colocaron encima de un

colchón de sacarosa (sacarosa 0.34 M resuspendido en 1 ml de buffer hipotónico) para purificar a los núcleos, y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos sin freno. Concluida la centrifugación, se retiró el sobrenadante y el botón nuclear se resuspendió en 200 µl de buffer de extracción (20 mM Hepes pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM EGTA pH 8) sin inhibidores de proteasas ni DTT. Este se sonicó en el bioruptor bajo las siguientes condiciones: *High* 10 ciclos 30off/30on a 4°C, una sola vez. Posteriormente la preparación se centrifugó a 14 Krpm durante 30 minutos a 4°C. El **sobrenadante el cual contiene las proteínas nucleares**, fue empleado para realizar los ensayos de zimografía.

6.5 Extractos de Eritrocitos

Para obtener los extractos de eritrocitos se utilizó el buffer de lisis *M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent* (PIERCE 78501). Brevemente se ocuparon de 1 a 2 ml de concentrado eritrocitario los que se colocaron en un tubo eppendorf y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos. Una vez terminada la centrifugación se retiró el sobrenadante y los eritrocitos se lavaron con PBS 1x (NaCl 0.13M, KCl 2.6 mM, Na₂POH₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM), dos veces y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos. Al botón eritrocitario se le agregó *M-PER® reagent*, en una proporción de 1:10 con respecto al volumen del paquete de eritrocitos y se incubó durante 10 minutos a 4°C con agitación constante. Finalmente la muestra se centrifugó a 14,000 g's durante 15 minutos para eliminar los *debris* celulares y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.6 Cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford

Esta técnica se realizó con el reactivo comercial "*Bio-Rad Protein Assay*", el reactivo funciona a base de un colorante que al unirse a las proteínas ocasiona un cambio de color y el cual se mide en el espectrofotómetro a

una densidad óptica de 595 nm. Para determinar la concentración de las proteínas de nuestros extractos de eritrocitos, citoplásmico y nuclear, se utilizó BSA como proteína de referencia para la formación de una curva estándar. Para lo cual se obtuvo una curva de referencia utilizando cinco concentraciones de BSA que van desde 1 µg hasta 10 µg de proteína, según el rango lineal de cada método, obteniendo un volumen final de 1000 µl de la siguiente manera: Blanco: 800 µl agua inyectable + 200 µl reactivo Bradford. 1) 1 µg/µl BSA + 799 µl agua inyectable + 200 µl reactivo Bradford. 2) 2 µg/µl BSA + 798 µl agua inyectable + 200 µl reactivo Bradford. 3) 4 µg/µl BSA + 796 µl agua inyectable + 200 µl reactivo Bradford. 4) 8 µg/µl BSA + 792 µl agua inyectable + 200 µl reactivo Bradford. 5) 10 µg/µl BSA + 799 µl agua inyectable + 200 µl reactivo Bradford. Todo esto para obtener la curva estándar y después para determinar la concentración de proteínas en nuestro extracto nuclear se colocaron: 3 µl de extracto + 797 µl agua inyectable + 200 µl reactivo Bradford. Todas estas muestras se mezclaron y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, se llevaron al espectrofotómetro y se realizó la lectura a una densidad óptica de 595 nm. Una vez obtenidos los valores de densidad óptica para cada dilución de BSA y de las muestras problema se graficó la cantidad de albumina contra la absorbancia obtenida.

6.7 Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) para extractos de eritrocitos humanos, nuclear y citoplásmico de *P. falciparum*

Los extractos obtenidos de eritrocitos humanos, fracción nuclear y fracción citoplásmica de *P. falciparum* se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes. En este tipo de geles el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), rutinariamente se emplea para este fin, pues asegura la disociación de las proteínas en sus subunidades, además de que carga negativamente a todas las proteínas

independientemente de su composición de aminoácidos. El gel de poliacrilamida fue hecho de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli, 1970. Los vidrios (10x8 cm) y los separadores (0.75 mm) empleados para hacer el gel, se ensamblaron según las instrucciones del fabricante (*Hoefler Amersham Biosciences*). En el molde se vació primero el gel resolutorio el cual tuvo la siguiente composición: acrilamida-bis acrilamida al 12% (30:1), Tris 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio (PSA) 0.05%, N, N, N, N-tetrametiletenediamina (TEMED) 0.005%. Al gel resolutorio se le agregó isopropanolol con el propósito de aplanar la superficie del gel. Una vez que el gel había polimerizado, el isopropanolol fue eliminado y el gel resolutorio se lavó con agua bidestilada. Posteriormente, se vertió el gel concentrador (sobre el gel resolutorio) el cual contenía: acrilamida-bis acrilamida al 4%, Tris 0.125M pH 6.8, SDS 0.1%, PSA 0.05% y TEMED 0.005% y se colocó inmediatamente el peine para formar los pozos, el gel se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Finalmente, el gel se colocó en la cámara de electroforesis (*Hoefler, Amersham Biosciences*) con buffer de corrida 1X (14.4 g de glicina, 3 g de Tris-base, 10 ml de SDS Al 10% y el volumen necesario de agua bidestilada para 1 L). Las muestras se prepararon agregando buffer laemmli 4X (2 ml de Tris 1 M pH 6.8, 4 ml de SDS 10%, 400 µl de 2-mercaptoetanol, 4 ml de glicerol) a una concentración final de 1X y se hirvieron a 100°C por 5 minutos para posteriormente centrifugarlas a 14,000 rpm durante 1 minuto. Estas muestras, se cargaron en el gel y éste se corrió a 120 V por aproximadamente 2 horas. Finalizada la corrida, el gel se fijó y tiñó con azul brillante de coomassie (metanol: ácido acético glacial: agua en una proporción 50:10:40 v/v) por 1 hora. Posteriormente, el gel se destiñó utilizando una solución que contenía: ácido acético al 7% y etanol al 25%; o bien el gel fue utilizado para los ensayos de Western Blot.

6.8 Western Blot (WB)

Al concluir la migración electroforética, se prepararon los materiales para realizar la transferencia de proteínas del gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo al protocolo descrito por Towbin *et al.* Para lo cual, en el armazón del plástico de la cámara de transferencia se armó un sándwich constituido por: una esponja, seguidas de tres piezas de papel filtro whatman, el gel, la membrana de nitrocelulosa, nuevamente tres piezas de papel filtro whatman y una esponja. Una vez armado el sándwich, éste fue colocado en el interior de la cámara de transferencia, a la cual se adicionó el buffer de transferencia (200 ml de metanol, 3 g de Tris-base, 14.4 g de glicina en 1 L). La cámara fue sumergida en hielo durante todo el proceso de transferencia y la transferencia se realizó durante 2 horas a 120 volts y 300 mAmp. Posteriormente, se analizó la eficiencia de la transferencia al teñir la membrana con rojo de "Ponceau" (rojo de "Ponceau" al 0.5% en ácido acético al 2%). Una vez que se verificó que las proteínas se habían transferido a la membrana, se procedió a bloquearla con una solución al 5% de leche en *PBS-Tween-20* al 0.05% durante dos horas en agitación constante a temperatura ambiente. Después la membrana fue incubada con los siguientes anticuerpos primarios: Histona H4 (Santa Cruz sc-8658-R) a una dilución 1:3,000, Aldolasa (Abcam 25751) a una dilución de 1:30,000, Ankirina 1 (Santa Cruz sc-12733) a una dilución de 1:200. Todos ellos diluidos en una solución de leche al 2% en *PBS-Tween 20* al 0.05% y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante.

Al día siguiente la membrana fue lavada 3 veces con una solución al 2% de leche en *PBS-Tween-20* al 0.05% durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente, la membrana se incubó con el ab secundario anti-Fc. de ratón o conejo acoplado a HRP (*Horse Radish Peroxidase*) en la misma solución a una dilución de 1:7,500 durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez concluido este tiempo la membrana se lavó 3 veces con *PBS-Tween 0.05%* en leche al 2%, durante

10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, para el revelado por quimioluminiscencia, se mezclaron las soluciones A+B del reactivo *ECL Western blotting detection* en una relación de 1:1, o con el kit de máxima sensibilidad *Super Signal Femto*, posteriormente se cubrieron con una película plástica y la membrana se expuso en el fotodocumentador *ChemiDoc* (Bio-Rad) y se analizaron con el *software Quantity One* de (Bio-Rad) a diferentes tiempos de exposición.

6.9 Separación electroforética en gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina (Zimografía de gelatina)

Para determinar la existencia de proteasas nucleares, se realizó una electroforesis en geles de SDS-PAGE copolimerizados con gelatina de acuerdo al protocolo, descrito por Toth M y Fridman R., (2001). El gel de SDS-PAGE copolimerizado con gelatina se realizó de la siguiente manera. Brevemente, Las concentraciones finales (cf.) para realizar el gel resolutivo fueron: 1.5 M Tris pH 8.8, 30% acrilamida, agua, 1 mg/mL de gelatina y 10% SDS, para la polimerización del gel 0.05% APS y 0.005% TEMED. Al gel resolutivo se le agregó isopropanol con el propósito de aplanar la superficie del gel. Una vez que el gel polimerizó, se lavó con agua bidestilada. Posteriormente se vertió el gel concentrador cuyas cf. fueron: 0.5 M Tris pH 6.8, 30% acrilamida, agua y 10% SDS, para la polimerización del gel, APS 0.05% y TEMED 0.005%.

Una vez que el gel polimerizó, se procedió a cargar las muestras tanto de la fracción nuclear como la de la fracción citoplásmica además de la del extracto de eritrocitos. Todas ellas se prepararon previamente, adicionando un buffer de muestra sin DTT 5X (4% SDS, 20% de glicerol, 0.01% de bromofenol azul, 125 mM de Tris-HCl), posteriormente estas muestras se centrifugaron y sin hervir se colocaron en los pozos del gel. Las muestras se corrieron a 120 volts en una cámara de electroforesis utilizando buffer de corrida 1X (Glicina 14.4 g, Tris-base 3g, SDS 10% 10 ml, agua a un volumen final de 1000ml).

Finalizada la migración, se desmontó el gel de la cámara de electroforesis y se procedió a lavar 2 veces durante 30 minutos con el buffer de lavado (2.5% Tritón X-100). Posteriormente se retiró el buffer de lavado y se le añadió el buffer de incubación fresco (Tris-HCL 20 mM, EDTA pH 8 5 mM, DTT 2 mM llevar a un pH de 7.5), y se incubó 24hrs a 37°C en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se tiñó el gel con azul brillante de coomassie (Metanol 50%, Ácido acético 10%, Agua 40% y azul de Coomassie 0.05%) durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación. Finalizada la incubación, se enjuagó el gel con un poco de solución de destinción (Metanol 25ml, ácido acético 35ml y agua 440ml), hasta obtener un patrón de bandas blancas sobre un fondo azul. En donde estas bandas blancas corresponden a la actividad de las proteasas que han degradado la gelatina.

6.10 Separación electroforética en gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina (Zimografía de gelatina) más incubación con inhibidores para las diferentes familias de proteasas.

Para determinar qué clase de proteasas se encuentran en el núcleo de *P. falciparum*. Se realizó una electroforesis en geles de SDS-PAGE copolimerizados con gelatina de acuerdo al protocolo, descrito por Toth M y Fridman R., (2001), el cual se describió previamente.

En dónde una vez realizado el gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina, se procedió a cargar la muestra solo con 50 µg de la fracción nuclear, las cuales se prepararon previamente con el buffer de muestra no reducido a una cf de 1X, se centrifugaron y sin hervir se colocaron en los pozos del gel. Posteriormente se realizó la separación electroforética a 120 volts en una cámara de electroforesis utilizando el buffer de corrida 1X (14.4 g de glicina, 3 g de Tris-base, 10 ml de SDS Al 10% y el volumen necesario de agua bidestilada para 1 L).

Finalizada la migración, se desmontó el gel de la cámara de electroforesis y se procedió a cortar los carriles en dónde se colocaron las muestras de extracto nuclear. Posteriormente, cada tira se colocó en un recipiente independiente y se incubó durante 3 horas con un inhibidor diferente, Antipaina 500 μ M (serín-cisteín proteasas), Bestatina 450 μ M (metalo proteasas), EDTA 100 mM (metalo proteasas), E-64 500 μ M (cisteín-proteasas), AEBSF 20 mM (serín- proteasas), Pepstatina A 10 μ g/ml (aspártico proteasas). Luego de la incubación con el inhibidor, se realizó el lavado de cada tira con el buffer de lavado dos veces durante 30 minutos cada uno para finalmente incubar cada tira con el buffer de actividad durante 24 horas a 37°C en agitación constante. Cumplido este tiempo, se tiñó cada tira del gel con azul brillante de coomassie (Etanol 30 ml, Ácido acético 10 ml, Agua 60 ml y azul de Coomassie 0.5 g) durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Finalizada la incubación, se enjuagó cada tira con un poco de solución de destinción (etanol 150 ml, ácido acético 35 ml y agua 315 ml) y se destiñó con la solución de destinción hasta obtener un patrón de bandas blancas sobre un fondo azul, esperando encontrar menos bandas en la tira donde se incubó con alguno de los inhibidores.

6.11 Electroforesis Bidimensional (2D)

Con el propósito de separar al conjunto de proteasas de acuerdo a su punto isoeléctrico y a su peso molecular, el extracto nuclear fue separado utilizando la electroforesis en segunda dimensión. Brevemente, se obtuvo el extracto nuclear asincrónico el cual se resuspendió en 50 μ l de buffer de muestra (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%) sin DTT, el cual se suplemento con Anfolitas de un rango de pH de 3-10 (Anfolitas al 2%). Posteriormente la muestra se llevó a un volumen final de 125 μ l con buffer de hidratación (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2%) el cual se completó con Anfolitas pH 3-10 (2%) y nuevamente no se agregó ni DTT ni inhibidores de proteasas a la muestra. La muestra fue resuspendida perfectamente y se le

adicionó un poco de azul de Bromofenol 0.01% para poder seguir la migración en la tira. La muestra se agregó sobre la tira hasta que el material se distribuyó perfectamente por capilaridad sobre la tira. Después de esto, se adicionó una cantidad suficiente de aceite mineral sobre la tira con el propósito de evitar la evaporación de la muestra y se cubrió con papel aluminio. La tira se dejó hidratando de 16 a 18 horas. Transcurrido este tiempo el exceso de aceite mineral fue eliminado y la tira fue colocada en el equipo ETTAn IP3PHOR junto con dos pats previamente humedecidas con agua MiliQ y depositadas en una pequeña fracción del gel. Los electrodos fueron colocados teniendo cuidado de no formar burbujas. La tira se migró con las condiciones siguientes: *1 step and hold 500 volts 1:00h, 2 Gradient 1,000 volts 1:00, 3 Gradient 8,000 volts 3:00h, 4 step and hold 8,000 volts 1 h 15 min.*

Una vez finalizado el isoelectroenfoco, la tira se incubó por 15 min a temperatura ambiente en buffer de equilibrio (Urea 6 M, Tris 1 M HCL pH 8.8 75 mM, Glicerol 87% -29.3%, SDS 2%, 1% azul de bromofenol 0.002%) con DTT (0.25 mg para 2.5 ml) y por ultimo 15 minutos más en buffer de equilibrio solo en agitación suave. Transcurrido este tiempo la tira se colocó en un gel SDS-PAGE al 12% y se migro a 60 volts.

6.12 Tinción con plata

Inmediatamente después de retirar el gel de la cámara de electroforesis se llevó acabo la tinción con plata de acuerdo al protocolo descrito por *Novex for life technologies* y el empleo del kit *SilverQuest™ Silver Staining. Catalog Number LC6070*. De esta forma, finalizada la separación electroforética el gel se lavó con agua MiliQ, posteriormente se incubó durante toda la noche con la solución de fijación (40 ml etanol, 10 ml ácido acético, 50 ml agua miliQ) en un agitador orbital en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se decantó la solución y se lavó el gel en etanol al 30% durante 10 minutos en agitación constante. Transcurrido este tiempo se decantó el etanol y al gel se le agregaron 100 ml de solución

sensibilizante (30 ml etanol, 10 ml de *sensitizing solution* y 60 ml agua miliQ) y nuevamente se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se decantó la solución sensibilizante y se lavó el gel en etanol al 30% durante 10 minutos, enseguida se lavó el gel en 100 ml de agua MiliQ durante 10 minutos. Después de esto se incubó el gel en 100 ml de solución de tinción (1 ml *staining solution*, 99 ml agua miliQ) durante 15 minutos. Una vez completada la tinción, se decantó la solución de tinción y se lavó el gel con 100 ml de agua MiliQ durante 60 segundos. Para incubar nuevamente el gel se incubó el gel en 100 ml de solución de revelado (10 ml *Developing solution*, 90 ml agua MiliQ) hasta que las bandas comenzaron a aparecer y se alcanzó la intensidad deseada. Finalmente para parar la reacción al gel se le agregó inmediatamente 10 ml de la solución de paro (*Stopper solution*) y se agitó suavemente durante 10 minutos. En este punto el color cambia de rosado a incoloro, lo que indica que el revelado se ha detenido. Se decantó la solución de paro y finalmente se lavó el gel con 100ml de agua MiliQ durante 10 minutos en agitación constante.

6.13 Espectrometría de masas

Una vez visualizados los puntos que corresponden a las proteínas separadas en base a su punto isoelectrico y peso molecular, estas se recuperaron y cada uno de ellos se cortó con la ayuda de un bisturí. Una vez recuperadas las proteínas de interés se sometieron a digestión trípica toda la noche a temperatura ambiente en 25 mM de buffer de bicarbonato de amonio. Los péptidos resultantes fueron extraídos del gel y analizados por espectrometría de masas. Las masas de los péptidos presentes en la mezcla se midieron de manera segura usando el MALDI-ToF MS para generar una huella de masa peptídica. El primer paso en la identificación consistió en usar la información de la huella de masa de péptidos para compararlas con el bando de datos del organismo a estudiar (*P. falciparum*). La huella de masa peptídica que está en la base de datos es

teórica ya que se basa en el número de sitios de corte que una proteína puede sufrir por la tripsina, la cual depende de su secuencia primaria. El mejor apareamiento permitió predecir de qué proteínas se trata y el gen que la codifica SEQUEST es el “software” más comúnmente empleado para analizar el espectro de masas de las muestras a estudiar.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico* sugiere la presencia de proteasas nucleares en *P. falciparum*

Para determinar la presencia de proteasas nucleares en *P. falciparum* se realizó un análisis *in silico* utilizando como base dos tablas ya reportadas por Wu, (2003) y Weißbach, (2017). En donde ellos identificaron 149 proteasas en este parásito.

De acuerdo, a lo reportado, estas proteasas pertenecen en su mayoría a la familia de las cisteín-proteasas (53/149), seguidas por las serín proteasas (35/149), luego las metalo proteasas (32/149) y finalmente las treonin y aspártico proteasas respectivamente (15/149 y 14/149) (figura 12).

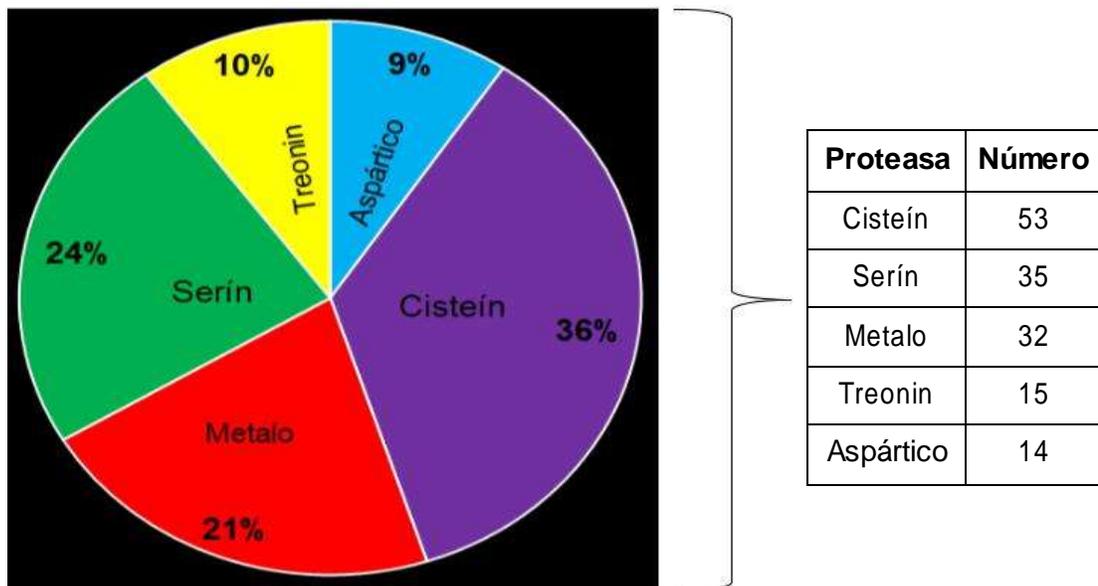


Figura 12. La mayoría de las proteasas reportadas en *P. falciparum* pertenecen a la familia de las cisteín y serín proteasas. Gráfica tipo pastel, en donde se observa la distribución de las proteasas reportadas por familia en *P. falciparum*.

Con el propósito de averiguar cuáles de las 149 proteasas previamente identificadas podrían tener una localización nuclear, se llevó a cabo la búsqueda de una secuencia de localización nuclear (NLS) en la secuencia primaria de cada una de estas proteasas. Esta NLS puede ser de dos tipos: una señal clásica monopartita constituida por un grupo de aminoácidos (aa) básicos o bien, una NLS bipartita constituida por dos secuencias de aa básicos separados por alrededor de 10-12 aa. Este análisis *in silico* se realizó con la ayuda de los programas http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi y <http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLSstradamus/>.

Estos programas toman en cuenta diversas puntuaciones de corte que van desde el 1 al 10, considerando que puntuaciones más altas indican actividades de NLS más fuertes. Brevemente el programa considera que una proteína con una puntuación de 10 hasta 6, se localiza en el núcleo, mientras que una puntuación de 5 a 3, sugiere que la proteína se puede localizar tanto en el núcleo como en el citoplasma y un valor de 2 a 1, diría que la proteína se ubica exclusivamente en el citoplasma. Debido a esto, nosotros tomamos en cuenta solo aquellas proteínas que tuvieron una puntuación mayor o igual a 6 para identificar a las proteasas con una probable localización nuclear.

De esta manera pudimos identificar al menos 58 de las 149 proteasas que cuentan con una secuencia de localización nuclear. De las cuales 37 presentan una secuencia bipartita y solo 21 una secuencia monopartita como se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Lista de proteasas con una probable localización nuclear en *P. falciparum*, identificadas a partir de un análisis *in silico*, organizadas de acuerdo al tipo de proteasa (cisteín, serín, aspártico, treonin y metalo proteasas).

Cisteín proteasas				
PlasmoDB ID	Sub-familia	Nombre	Estadio de Mayor Expresión	Secuencia de localización nuclear
PF3D7_13624	Calpaínas	Calpaína	8 hrs Post	Monopartita

00			invasión Anillo	Pos. 12 RKIKKRKKE
PF3D7_12478 00	Dipeptidil aminopepti dasa	Dipeptidil aminopeptida sa 2 (DPAP2)	40 – 48 hrs Post invasión Esquizonte tardío - gametocito	Monopartita Pos. 243 RRSNYKKFRFS
PF3D7_02078 00	Antígenos ricos en serina	Antígeno repetido de serina 3 (SERA3)	40-48 hrs PO Post invasión Trofozoíto tardío - Esquizonte	Bipartita Pos. 197 DILTIKWVKVYEEKSATPQKSEE NTVDIKLYKLP
PF3D7_02075 00	Antígenos ricos en serina	Antígeno repetido de serina 6 (SERA6)	32- 48 hrs Post invasión Trofozoíto tardío - Esquizonte	Bipartita Pos. 364 EIKVKAQDDFNPNEYKLIESID NILSKIYK
PF3D7_02074 00	Antígenos ricos en serina	Antígeno repetido de serina 7 (SERA7)	32-48 hrs Post invasión Trofozoíto tardío - esquizonte	Bipartita Pos. 649 RPRQRMTTKGYISYESSYFSD NMDLFIKIIKRE
PF3D7_02073 00	Antígenos ricos en serina	Antígeno repetido de serina 8 (SERA8)	40- 48 hrs Post invasión Anillo; esquizonte	Bipartita Pos. 185 WVKDRAGFKDDDKPSVGIPE RKIFKPY
PF3D7_09028 00	Antígenos ricos en serina	Antígeno repetido de serina 9 (SERA9)	32 hrs Post invasión Trofozoíto tardío	Bipartita Pos. 161 KLRKKGKDEYEEKVIGIDLLKNV CETGKNFKF
PF3D7_14605 00	UCH	Proteína conservada de Plasmodium, función desconocida	0-8 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto temprano	Monopartita Pos. 287 RRRKRKKNM
PF3D7_01043 00	UCH	Ubiquitin hidrolasa carboxi terminal 1 (UBP1)	0 – 8 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto temprano	Bipartita Pos. 1426 YLKKNYDQENEKDNEYENEKS YKKSTRP
PF3D7_05272 00	UCH	Ubiquitin hidrolasa carboxi terminal	40 – 48 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, esquizonte	Bipartita Pos. 409 KICRKVSFPDFTDMYDFCSEKI KEELKIARDI
PF3D7_05167 00	UCH	Ubiquitin hidrolasa	8 hrs; 40-48 hrs Post	Monopartita Pos. 752 KIVKKRKGL



		carboxi terminal 2	invasión Trofozoíto tardío, esquizonte	
PF3D7_0726500	UCH	Ubiquitin hidrolasa carboxi terminal	8-16 hrs Post invasión Trofozoíto tardío	Monopartita Pos. 311 FHKKKRKYK
PF3D7_1317000	UCH	U4/U6.U5 Proteína asociada tri-snRNP 2 (USP39)	32 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto tardío	Monopartita Pos. 312 KMLKKRKLKLS
PF3D7_1414700	UCH	Ubiquitin hidrolasa carboxi terminal	0-8 hrs Post invasión Anillo y trofozoíto temprano	Bipartita Pos. 76 KNKKRRKEKNIISNKSRSKFLKF
PF3D7_1231900	Otros	Proteína conservada de Plasmodium, función desconocida	24 hrs Post invasión Trofozoíto tardío	Monopartita Pos. 756 NKKKKRKKM
PF3D7_1438400	Otros	Proteína similar a metacaspasa (MCA2)	40-48 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, esquizonte, gametocito	Monopartita Pos. 1892 MLKSSKKKCLLIF
PF3D7_1233900	Otros	Proteasa específica de sentrina 1 (SEN1)	24-32 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, trofozoíto tardío	Bipartita Pos. 758 LKEKYPEDIEKDAYDDETKKKKIDKNI
PF3D7_0801700	Otros	Proteasa específica de sentrina 2, probable (SEN2)	24-32 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, trofozoíto tardío	Bipartita Pos. 96 KKKKVKLYLCLNKKNDEIFIYQVQCKYTKKK
PF3D7_0922400	Otros	Acido para aminobenzoico o sintentasa (pBAS)	32 hrs Post invasión Trofozoitos tardíos, gametocitos	Monopartita Pos. 355 NLRKRRKEYK
PF3D7_1031400.1	Otros	Cisteín protease	40-48 hrs Post invasión	Bipartita Pos. 888

		similar a OTU, probable	Esquizonte, gametocito	DKILNKWKCSKNLYEEFLIKEK HKYYKFIKGG
PF3D7_10314 00.2	Otros	Cistein proteasa similar a OTU, probable	40-48 hrs Post invasión Esquizonte, gametocito	Bipartita Pos. 888 DKILNKWKCSKNLYEEFLIKEK HKYYKFIKGG
PF3D7_11119 00	Otros	Proteína conservada de Plasmodium, función desconocida	32 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, gametocito	Bipartita Pos. 191 DSSLNKPILLPTNKDVNNHLINI VKNNKIQKSD
PF3D7_13082 00	Otros	Carbamoil fosfatasa Sintetasa (cpsII)	8 hrs, 24 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto temprano	Monopartita Pos. 1238 LNMKRKICTL

Aspártico proteasas

PlasmoDB ID	Subfamilia	Nombre	Estadio de mayor expresión	Secuencia de localización nuclear
PF3D7_14302 00	Plasmepsinas	Plasmepsina IX (PMIX)	40-48 hrs Post invasión Esquizontes	Monopartita Pos. 89 IPSKRKHIQD
PF3D7_14080 00	Plasmepsinas	Plasmepsina II (PMII)	24 hrs Post invasión Trofozoítos tempranos, Trofozoítos tardíos	Bipartita Pos. 6 REHDFKHGFIKSNSTFDGLNID NSKNKKKIQ

Serín proteasas

PlasmoDB ID	Subfamilia	Nombre	Estadio de mayor expresión	Secuencia de localización nuclear
PF3D7_0321 500	Otros	Peptidasa, probable	32-48 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, gametocito	Bipartita Pos. 6 NTIKRVPPFMKELEDIYNICYS GLNKIDKCI
PF3D7_0307 400	Otros	Proteasa proteolítica	32 hrs Post invasión	Monopartita Pos. 159 KKNKRRKYS

		Clp dependiente de ATPATP subunidad (ClpP)	Trofozoíto tardío, gametocito	
PF3D7_0816 600	Otros	Proteína chaperona ClpB1 (ClpB1)	32 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, trofozoíto tardío.	Bipartita Pos. 736 RILKDEVTSEDIVNIVSMSTGIR LNKLLKSE
PF3D7_1406 600	Otros	ATP-dependent Clp protease, putative (ClpC)	32 – 40 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, esquizonte	Monopartita Pos. 1251 LKKRIKKRKN
PF3D7_1116 800	Otros	Proteína de choque térmico 101, proteína chaperona ClpB2 (HSP101)	8-16 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto temprano	Bipartita Pos. 800 RIDKIGVFEPLNKKNLHKIVALR FKKLEKR
PF3D7_1414 900	Otros	Proteasa dependiente de ATP, probable	24 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, gametocito	Monopartita Pos. 26 RTSTNKKRNSYENDLKRKVEV KC
PF3D7_1320 400	Otros	Peptidasa señal tipo I (SPB)	24 hrs Post invasión 40 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, trofozoíto tardío, gametocito	Bipartita Pos. 125 NNNKRKKINFFSHVEPIKDFLK FTKKIVL
PF3D7_0507 500	Proteasa similar a subtilisina	Proteasa similar a subtilisina 1 (SUB1)	40-48hrs Post invasión Trofozoíto tardío, esquizonte	Monopartita Pos. 266 ATSKRKRHST
PF3D7_1136 900	Proteasa similar a subtilisina	Proteasa similar a subtilisina 2 (SUB2)	40-48hrs Post invasión Esquizonte, gametocito	Monopartita Pos. 37 YKLRKRNRL
PF3D7_0506 900	Proteasa romboidal	Proteasa romboidal ROM4 (ROM4)	40-48 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, esquizonte	Bipartita Pos. 13 EKKRSSIFSDLEIPQGDVKKKAS SI
PF3D7_1345	Proteasa	Proteasa	24 hrs, 48 hrs	Bipartita

200	romboidal	romboidal ROM6, probable (ROM6)	Post invasión Trofozoíto tardy, gametocito	Pos. 62 KEKFKIIVYASLYFFTCDYLYH EFILKNSKNE
PF3D7_1411 200	Proteasa romboidal	Proteasa romboidal ROM8 (ROM8)	8 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto temprano	Bipartita Pos. 194 PDRKKTRDDLNDDNENSCSS FTRRGKYNKTK
PF3D7_0826 200	Otros	Hidrolasa alfa/beta, probable	48 hrs Post invasión Esquizonte, gametocito	Bipartita Pos. 411 KKYIKQVKKIILISPVGVLEKKP FPLKILKL
PF3D7_0812 200	Otros	Serín protease similar a tripsina, probable	40 hrs Post invasión Trofozoíto tardy	Bipartita Pos. 12 RTHELWKHRLSFLPKLLQIST MNAKMYKFD
PF3D7_0812 220	Otros	GTPasa, probable	40 hrs Post invasión Trofozoíto tardío	Bipartita Pos. 160 FENEKRKRLFIITDMPGLGYAE GIGKKKMDY
PF3D7_1142 900	Otros	Proteína conservada de Plasmodium, función desconocida	40-48 hrs Post invasión Esquizonte, gametocito	Bipartita Pos. 51 ENIKLKRCKKHLETHILEENIIF EKNFKNYEKI
PF3D7_1410 100	Otros	Alfa/beta hidrolasa, probable ($\alpha\beta$ H)	24 hrs Post invasión Gametocito	Bipartita Pos. 181 GLAKPRHRFLHLLKHNIRLCL RVAKRYSH
PF3D7_0731 800	Otros	Alfa/beta hidrolasa, probable (GEXP08)	0-8 hrs Post invasión Anillo, gametocito	Monopartita Pos. 616 KNYKRKKNST
PF3D7_0403 800	Otros	Alfa/beta hidrolasa, probable	0 hrs Post invasión gametocito	Bipartita Pos. 271 EKLKDKLKEKIGDKKEEKDLTS KIKKNEKVI

Treonin proteasas

PlasmoDB ID	Subfamilia	Nombre	Estadio de mayor expresión	Secuencia de localización nuclear
PF3D7_1011	Treonin	Subunidad	32 hrs Post	Bipartita

400	Proteasa	beta tipo 5 del proteosoma	invasión Trofozoíto tardío, gametocito	Pos. 95 IEINKNILGTMA GGAADCLYW EKYLGKIIKIY
-----	----------	----------------------------	--	--

Metalo proteasa				
PlasmoDB ID	Subfamilia	Nombre	Estadio de mayor expresión	Secuencia de localización nuclear
PF3D7_1311800	Metalo proteasa	Alanil aminopeptidasa familia M1 (M1-AP)	24 hrs Post invasión Trofozoíto temprano	Bipartita Pos. 373 RFNDPHLKPCYLFVAVGDLK HLSATYITKYTKKK
PF3D7_1118300	Metalo proteasa	Insulinasa, probable	0-8 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto tardío	Monopartita Pos. 238 LNPSQKKQKIDINNY
PF3D7_1440200	Metalo proteasa	Peptidasa de procesamiento estromal, probable (SPP)	24 -32 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, trofozoíto tardío	Bipartita Pos. 986 LKNQKEIENYELNGIKVNLYK TKVDK
PF3D7_0804400	Metalo proteasa	Aminopeptidasa de metionina 1c, probable (METAP1c)	32 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, gametocito	Monopartita Pos. 378 NEKKKRKKFYDF
PF3D7_1119600	Metalo proteasa	Zinc metaloproteasa dependiente de ATP FTSH, probable	32 hrs Post invasión Anillo, trofozoíto temprano, trofozoíto tardío	Bipartita Pos. 551 RELFAQARKHAPSIIFIDE IDAV GRKRSKG
PF3D7_0103400	Metalo proteasa	Zinc-carboxipeptidasa, probable	32 hrs Post invasión Anillo, esquizonte, gametocito	Bipartita Pos. 1030 RKDEKRSLSPKPKKKKKKKK KII
PF3D7_0517400	Metalo proteasa	Subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-	24-32 hrs Post invasión Esquizonte	Bipartita Pos. 1112 RAKKDDKKRFAYKSDEDDEG YNKRKKKKKN

		L)		
PF3D7_0527 300	Metalo proteasa	Aminopeptidasa de metionina 1a, probable (METAP1a)	32 hrs Post invasión Anillo, gametocito	Bipartita Pos. 16 FPKKGKFKQHTYILTPKLNKSK LPERKTFKPT
PF3D7_0913 500	Metalo proteasa	Proteasa, probable	40 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, gametocito	Bipartita Pos. 54 NKIKVNLSEYNSVNNKTNEQ NNISKHIKE
PF3D7_1005 600	Metalo proteasa	Proteína DnaJ, probable	8 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, gametocito	Bipartita Pos. 51 RYTNIFRKIQEAYECLTNEVQ RKWYDRNRKRIE
PF3D7_1009 500	Metalo proteasa	Metalopeptidasa, probable	32 hrs Post invasión Trofozoíto tardío, gametocito	Monopartita Pos. 37 VLPIMKKRRFRVE
PF3D7_1441 700	Metalo proteasa	Metaloproteasa, probable (MP)	8 hrs, 24 hrs Post invasión Anillo, gametocito	Bipartita Pos. 429 FDKCLHDYWPFMCPPEQDSK YKPSKIFKKD
PF3D7_1472 400	Metalo proteasa	Alanil aminopeptidasa familia M1, probable	24 hrs Post invasión Trofozoíto temprano, trofozoíto tardío, gametocito	Monopartita Pos. 275 RKRKRKKKS

Un nuevo análisis efectuado con estas probables 58 proteasas nucleares nos permitió averiguar que la mayoría de estas pertenecen a la familia de las cisteín proteasas (23/52), seguidas por las serín proteasas (19/52), después las metalo proteasas (13/52), luego aspártico proteasas (2/52) y finalmente las treonin proteasas (1/52). Es decir, 42 de las 58 son cisteín y serín proteasas (Figura 13).

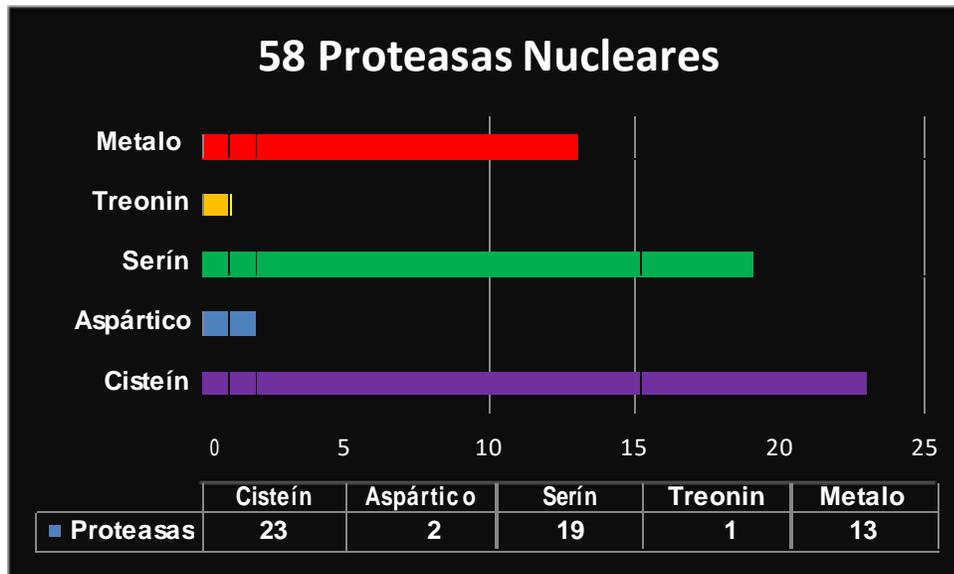


Figura 13. La mayoría de las posibles proteasas nucleares de *P. falciparum* son cisteín y serín proteasas. Gráfica tipo barra, en donde se observa la distribución por familia de las proteasas con una probable localización nuclear de *P. falciparum*.

Finalmente, procedimos a averiguar en qué fase del ciclo intraeritrocítico (anillos, trofozoítos y esquizontes) se expresan preferentemente estas proteasas mediante el empleo del transcriptoma de este parásito (<http://plasmodb.org/plasmo/>). Este análisis sugiere que el RNA mensajero de estas proteasas se expresan mayoritariamente durante el estadio de trofozoítos, seguido por el estadio de esquizontes y finalmente el estadio de anillos (Figura 14).

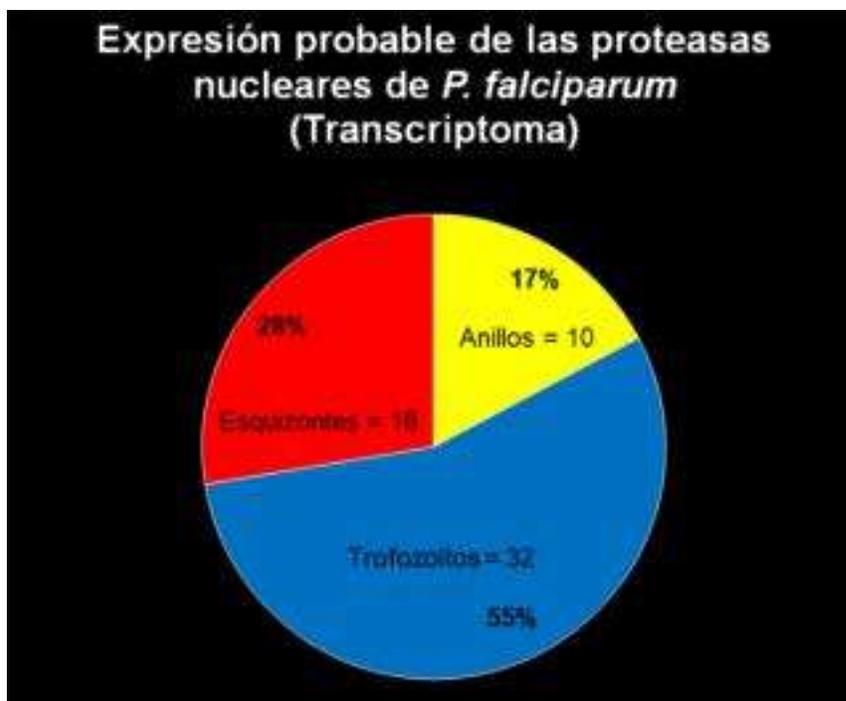


Figura 14. La mayoría de las probables proteasas nucleares se expresan principalmente en la etapa de trofozoítos. Gráfica tipo pastel, en donde se observa la expresión probable de los RNA mensajeros de las proteasas con una probable localización nuclear de *P. falciparum*.

Por lo que en conclusión, de todos estos análisis *in silico* podemos decir que 58 de las 149 proteasas reportadas para *P. falciparum* podrían tener una localización nuclear, que la mayoría de estas podrían pertenecer a la familia de las serín y cisteín proteasas y que la transcripción de la mayoría de estas probables proteasas nucleares se lleva a cabo en la etapa de trofozoíto.

7.2 En *P. falciparum* existen otras proteasas nucleares

Si bien el análisis *in silico* sugería la presencia de 58 probables proteasas nucleares procedimos a demostrar experimentalmente la existencia de al menos algunas de estas. Para lo cual realizamos un fraccionamiento celular para obtener extractos nucleares y citoplásmicos a partir de cultivos asincrónicos de la cepa 3D7 de *P. falciparum*, así como extractos de eritrocitos. Esto último era importante ya que en el interior del eritrocito es

donde este parásito crece y lleva a cabo su diferenciación. De tal manera que la obtención de extractos de eritrocitos nos permitiría descartar que los extractos nucleares o citoplásmicos se encontraran contaminados con proteínas o proteasas del eritrocito. Una vez obtenidos estas 3 fracciones (eritrocitaria, citoplásmica y nuclear) se procedió a realizar una separación electroforética en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), el cual se tiñó con coomassie y en donde se colocó una muestra correspondiente a 50 µg de cada extracto obtenido (figura 15).

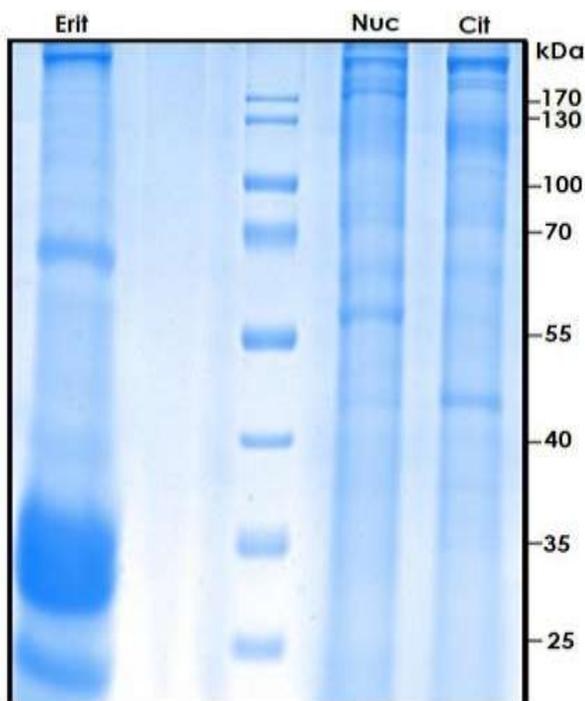


Figura 15. Patrón diferencial de proteínas en los tres extractos obtenidos. Gel SDS PAGE al 12% teñido con Azul de coomassie, en donde se muestra un patrón distinto de proteínas en las tres fracciones analizadas. Eritrocitos (erit), nuclear (nuc) y citoplásmica (cit).

Como se puede observar en la figura 15 existe un patrón diferencial de proteínas en las fracciones examinadas (extracto total de eritrocitos, extracto nuclear y extracto citoplásmico asincrónico), lo que nos sugería que nuestras preparaciones estaban correctamente purificadas. Sin embargo, para demostrarlo se realizó un análisis de Western Blot (WB), utilizando anticuerpos específicos para cada una de estas fracciones: -

Ankirina para el extracto total de eritrocitos; -Aldolasa para la fracción citoplásmica y α -Histona H4 (H4) para la fracción nuclear, en donde estas dos últimas fracciones fueron obtenidas a partir de cultivos asincrónicos de la cepa 3D7 de *P. falciparum*, (figura 16).

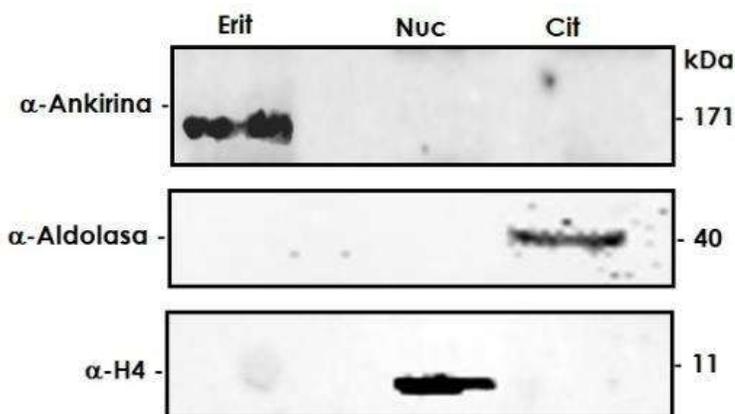


Figura 16. Los extractos nucleares no se encuentran contaminados con alguna otra fracción obtenida. Resultado de WB, en donde se ocuparon anticuerpos específicos para cada fracción obtenida (-Ankirina para el extracto total de eritrocitos, -Aldolasa para la fracción citoplásmica y α -H4 para la fracción nuclear).

El resultado de WB mostró que el anticuerpo -Ankirina solamente se detectó en el extracto de eritrocitos no así en el extracto citoplásmico ni en el nuclear de *P. falciparum*. Mientras que el anticuerpo -Aldolasa únicamente detectó una banda de 40 kDa en la fracción citoplásmica no así en la fracción de eritrocitos ni en la nuclear y finalmente el anticuerpo α -H4 exclusivamente se observa en la fracción nuclear y reconoce una proteína de 11 kDa y está ausente en la fracción citoplásmica y en el extracto de eritrocitos, (figura 16). Lo que nos indica que nuestros extractos nucleares no se encontraban contaminados con proteínas citoplásmicas ni de eritrocitos. Por lo que entonces el empleo de esta fracción nuclear nos permitiría observar solamente la actividad proteolítica de las proteínas provenientes del núcleo de este parásito.

Una vez que ya contábamos con los extractos nucleares procedimos a demostrar la presencia de las proteasas en el núcleo de este parásito. Para lo cual, se realizaron ensayos de zimografía. Esta técnica consiste en una separación electroforética en un gel de poliacrilamida copolimerizado con gelatina, de las proteínas presentes en la muestra de extracto nuclear en presencia de un buffer no reductor, seguido de la separación electroforética. Una vez terminada la separación electroforética el gel con las muestras se incubó en un buffer de actividad pH 7.5 (similar al del núcleo) a 37°C durante 24 hrs. Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie toda la noche y se destiñó al día siguiente. En donde se observarían bandas blancas sobre un fondo azul, correspondientes al sitio donde la proteasa llevó a cabo su actividad (Figura 17).

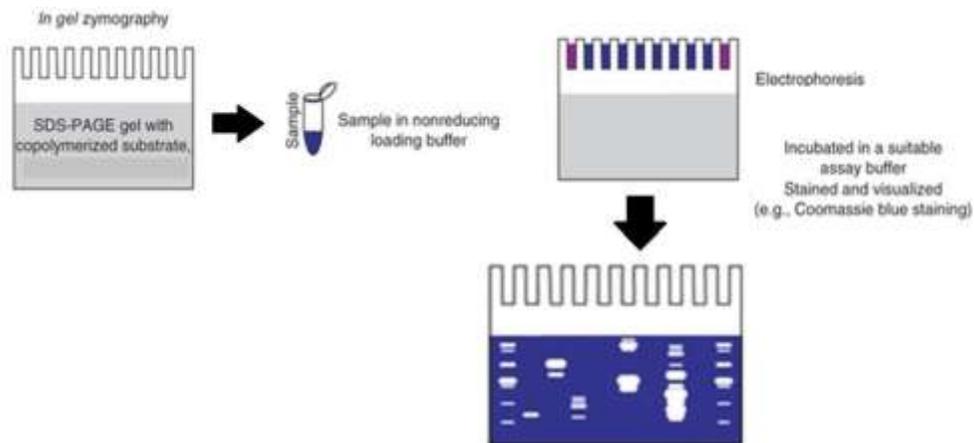


Figura 17. Representación esquemática del protocolo de zimografía empleado para detectar la actividad de proteasa de las proteínas nucleares de *P. falciparum*.

El resultado se muestra en la figura 18 en donde encontramos que en el extracto de eritrocitos no se observa ninguna banda indicando que a pH 7.5 y bajo estas condiciones no presenta ninguna actividad de proteasa. En lo que respecta al extracto citoplásmico, se observan dos bandas una de 60 kDa y otra de aproximadamente 45 kDa. Mientras que en el extracto

nuclear se aprecian varias bandas con actividad de proteasa que van desde los 55 a los 23 kDa. El hecho de que en el extracto citoplásmico exista una pobre actividad se puede explicar por qué el buffer de incubación que se empleó en este ensayo favorece la actividad de las proteasas nucleares ya que estas presentan una actividad a un pH de 7.5 y la gran mayoría de las proteasas citoplásmicas presenta una actividad a un pH de 5.5. Además debido a que el eritrocito no posee núcleo, no se observa actividad en esta fracción, lo que explicaría el resultado obtenido de actividad de las proteasas en estas 3 fracciones, (figura 18).

Por lo que estos resultados indicaban que en los extractos nucleares obtenidos de cultivos asincrónicos de la cepa 3D7 de *P. falciparum* existían proteínas capaces de degradar a la gelatina, es decir existían varias proteasas nucleares y que además parecían ser nucleares ya que su actividad se observaba a un pH 7.5 que es el pH que existe en el núcleo.

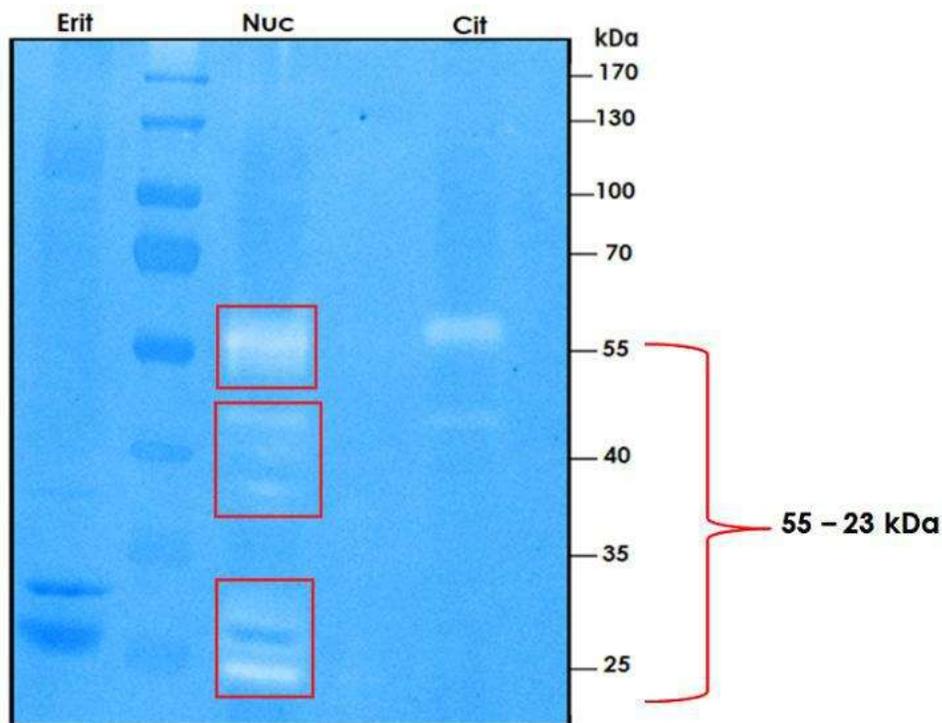


Figura 18. Existen proteasas en el núcleo de *P. falciparum* con actividad a un pH de 7.5. Ensayo de zimografía en gel copolimerizado con gelatina, en donde se observa la actividad de las proteasas en los tres extractos obtenidos (eritrocitos, nuclear y citoplásmico).

Debido a que en el resultado anterior habíamos utilizado un gel de SDS-PAGE copolimerizado con gelatina al 10% y a que no habíamos obtenido una buena resolución de nuestras bandas proteolíticas, procedimos a realizar la separación electroforética de nuestras muestras en un gel más concentrado al 12%. Por lo que entonces obtuvimos una mejor resolución de las diferentes áreas de actividad, con lo cual podemos definir 3 zonas: una de ellas corresponde a las proteasas que tienen un peso molecular (PM) de 55 a 47 kDa, seguido por un área que va de los 30 a 36 kDa y una tercera que va de los 28 a los 23 kDa. (Figura 19)

Por lo que todos estos resultados permiten decir que en el núcleo de *P. falciparum* existen proteasas nucleares. Siendo la primera vez que se demuestra la actividad de proteasas nucleares en este parásito.

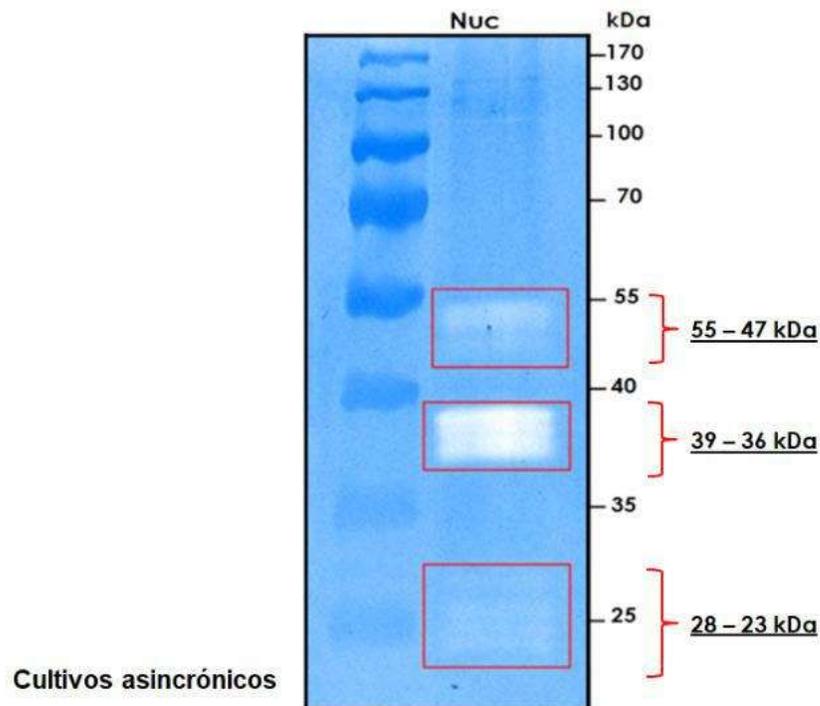


Figura 19. Existen varias proteasas en el núcleo de *P. falciparum*. Ensayo de zimografía en gel copolimerizado con gelatina al 12%, en donde se solo se colocó la muestra correspondiente al extracto nuclear asincrónico. Se observan 3 áreas de actividad proteolítica que van de los 55 a los 23 kDa.

7.3 Las proteasas nucleares de *P. falciparum* presentan actividad de manera estadio específico.

Para establecer si estas proteasas nucleares presentan una actividad de manera estadio específico; el cultivo asincrónico de *P. falciparum*, se sincronizó con sorbitol. A través de este método se pueden obtener parásitos en los 3 estadios del ciclo intraeritrocítico (anillos, trofozoítos y esquizontes). Una vez obtenidos los extractos nucleares se procedió a realizar el ensayo de zimografía para cada una de estas fracciones. Estos ensayos de zimografía se realizaron de manera estadio independiente y no al mismo tiempo en un solo gel, ya que debido a que la actividad de la proteasa es muy lábil, esta se pierde conforme pasa el tiempo y para obtener la actividad proteolítica de los 3 estadios al mismo tiempo tendríamos que esperar un total de 48 hrs y al realizar el ensayo de actividad con los 3 estadios perderíamos actividad, (resultado no mostrado). Por lo que entonces cada ensayo de zimografía, se realizó de manera independiente, es decir, una vez obtenidos los parásitos en estadio de anillos a las 14 horas post-invasión se realizó el ensayos de zimografía, y lo mismos se efectuó con los extractos obtenidos de los trofozoítos a las 27 hrs post-invasión y esto mismos se llevó a cabo para los extractos proteicos de los esquizontes a las 42 hrs post-invasión. Es decir cada ensayo de zimografía se realizó independientemente. Un ejemplo representativo de al menos dos ensayos efectuados para cada estadio se muestra en la figura 20.

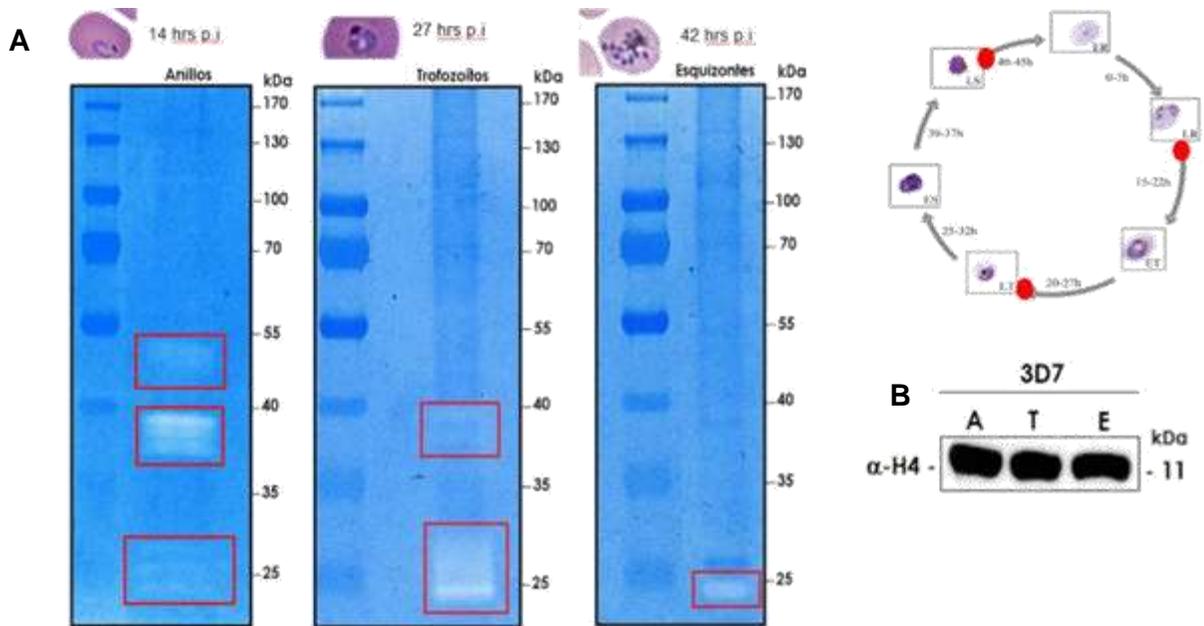


Figura 20. La actividad de las proteasas nucleares de *P. falciparum* es estadio-específico. A. Ensayo de zimografía en gel copolimerizado con gelatina para cada uno de los estadios del ciclo intraeritrocítico. **B.** Ensayo de WB donde se muestra el control de carga con el anticuerpo -H4, donde se observa la misma cantidad de proteína para cada ensayo independiente.

Como se aprecia en la figura 20A, en el estadio de anillos las tres áreas de actividad proteolítica se conservan (de 55 a 23 kDa). Mientras que, en el estadio de trofozoitos se pierde la actividad en el área que va de los 55 a 47 kDa y durante el estadio de esquizontes solo se conserva la actividad de las proteasas que se encuentran entre los 25 a 23 kDa.

Además también se realizó un ensayo de WB (figura 20B), incubado con el anticuerpo que reconoce a la histona H4 como control de carga para los 3 estadios. Por lo que este resultado demuestra que se colocó la misma cantidad de proteína en cada ensayo de zimografía correspondiente a 53 mg de proteína de cada extracto nuclear (anillos, trofozoitos y esquizontes) y que la diferencia en la actividad de proteasa detectada en nuestros ensayos no se deben a que se hayan empleado diferentes cantidades de extracto nuclear para cada estadio.

Con este resultado demostramos que las proteasas de *P. falciparum* poseen una actividad proteolítica estadio específico, y que además la mayor actividad proteolítica se observa en el estadio de anillos.

7.4 Las proteasas nucleares encontradas para *P. falciparum* pertenecen a la familia de las serín y cisteín proteasas

Para determinar qué clase de proteasas nucleares existen en *P. falciparum*, es decir, si son cisteín, serín, metalo, treonin o aspártico proteasas, se realizó el mismo ensayo de zimografía con extractos nucleares asincrónicos y ocupando inhibidores para los diferentes tipos de proteasas. Para lo cual, una vez realizada la separación electroforética, se obtuvo el gel y se cortó en tiras. Cada tira se incubó con un inhibidor diferente para cada tipo de proteasa, los inhibidores empleados así como su especificidad se muestran en la tabla I. Cada una de las tiras con su inhibidor se incubó con el buffer de actividad (pH 7.5) a 37°C durante 24 horas. Terminada la incubación las tiras se tñeron con azul de Coomassie toda la noche, al día siguiente se destiñeron. Una representación esquemática de esta metodología se observa en la figura 21. Finalmente al concluir este ensayo nosotros esperábamos que en donde se colocaron los inhibidores en algunos casos se observara una menor cantidad de bandas.

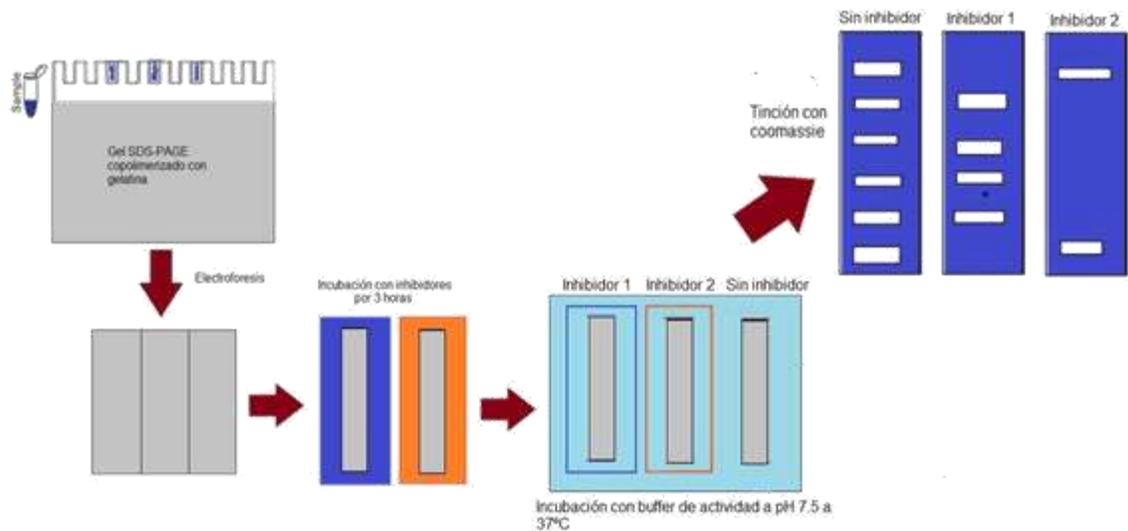


Figura 21. Representación esquemática del ensayo de zimografía en presencia de inhibidores. Representación esquemática del ensayo de zimografía en gel copolimerizado con gelatina incubado con inhibidores para las diferentes familias de proteasas.

Para la elección de los inhibidores que utilizamos en nuestros ensayos de inhibición nos basamos en nuestro análisis *in silico* (figura 13), en donde encontramos que la mayoría de las proteasas con probable localización nuclear pertenecen a los tipos de las serín, cisteín y metalo proteasas. Por lo que entonces, se procedió a ocupar inhibidores para estas familias de proteasas. Con el objeto de inhibir la actividad de las serín y cisteín proteasas se ocupó el inhibidor Antipain a una concentración de 500 μM para las cisteín y serín proteasas; y los inhibidores de EDTA a una concentración de 100 mM y Bestatina a una concentración de 450 μM , para bloquear la actividad de las metalo proteasas, (figura 22).

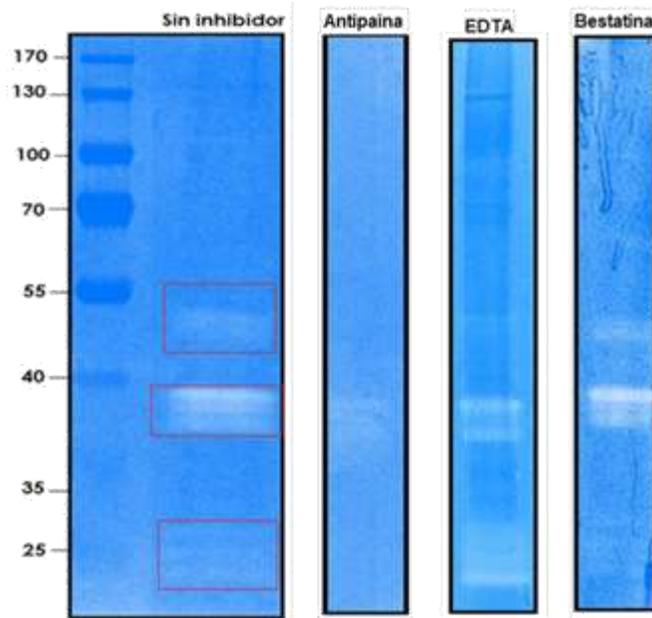


Figura 22. Las proteasas presentes en el núcleo de *P. falciparum* pertenecen a la familia de las serín y cisteín proteasas. Ensayo de zimografía en gel copolimerizado con gelatina y con inhibidores para serín, cisteín y metalo proteasas.

El resultado se aprecia en la figura 22 en donde se observa que en el extracto nuclear sin inhibidor se aprecian las mismas actividades proteolíticas ya mencionadas que van de los 55 a los 23 kDa. Sin embargo, cuando ocupamos el inhibidor de Antipaina se pierden las áreas de actividad proteolítica que van de los 55 a 47 kDa y la que va de 28 a 23 kDa. Además se observa un poco la actividad que va de los 39 a 36 kDa. Finalmente cuando se utilizó el inhibidor de EDTA la actividad proteolítica que va de los 55 a los 47 kDa se observa de forma regular, mientras que la actividad que va de los 39 a 36 kDa y la de los 28 a 23 kDa se conservan. Y al ocupar Bestatina la actividad proteolítica que se encuentra en el rango de los 55 a 23 kDa se mantienen.

Por lo que estos resultados nos indican que las proteasas presentes en el núcleo de *P. falciparum* principalmente pertenecen a los tipos de las serín y cisteín proteasas, lo cual se esperaba en base a nuestro análisis *in silico*.

7.5 Identificación de una proteasa nuclear

Finalmente para identificar al menos una de estas proteasas nucleares que observábamos en nuestros geles de poliacrilamida co-polimerizados con gelatina, se recuperaron las 3 bandas obtenidas en el ensayo de zimografía con los extractos nucleares asincrónicos, la primera que va de los 55 a 47 kDa, la segunda que va de los 39 a 36 kDa y la tercera que va de los 28 a 23 kDa, (figura 19). Estas tres bandas se enviaron a analizar por espectrometría de masas (MS) al laboratorio MS Bioworks, LLC en Ann Arbor, Michigan, EUA. Las proteínas identificadas se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Proteínas detectadas mediante espectrometría de masas.

Nombre	NCBI or SwissProt Accession #	Péptidos exclusivos	Mascot Score
Regulador transcripcional, probable	gi 124506267	8	235
Fosfoproteína ribosomal	gi 39722357	13	603
Proteína hipotética MAL13P1.23	gi 124513666	11	383
Proteína ribosomal de la familia L5, probable	gi 12480877	5	235
Proteína hipotética PF11_0055	gi 124803477	5	200
Proteína de ensamblaje de nucleosoma	gi 124805458	3	178
Producto del gen MCP1	gi 604220	2	155
Aspártico Proteínasa	gi 858754	2	143
Proteína relacionada con el factor de replicación A	gi 124506649	2	138
Proteína ribosomal L1, probable	gi 124809402	3	128
Proteína ribosomal L30e	gi 124802443	2	117
Factor de elongación alfa 1 (EF-1-alpha)	gi 119153	3	116
Antígeno QF122	gi 124802200	4	114
Antígeno nuclear de proliferación celular	gi 124513948	3	110
Endonucleasa Apn1 apurinica/apirimidinica	gi 15076900	2	101
Casein Cinasa II subunidad	gi 124513578	3	96

regulatoria			
Proteína de unión a RNA, probable	gi 124506883	4	95
Proteína hipotética, conservada	gi 124802685	1	86
Caseín cinasa II, subunidad alfa	gi 124803615	1	85
Proteína de unión a RNA, probable	gi 124512318	1	53
Proteína P2 acidica ribosomal 60S	gi 124504853	1	51
Proteína hipotética MAL8P1.95	gi 124512520	1	49
Caseín cinasa II cadena beta	gi 124803462	1	49
Pirofosfatasa sintasa de farnesil, probable	gi 29124957	2	48
Proteína S3A ribosomal 40S	gi 124505117	1	47
Proteína Ribosomal 60S L12	gi 124506259	8	440
Proteína ribosomal de la familia L5	gi 124808771	7	375
Proteína P1 acidica 60S ribosomal	gi 124803451	2	254
Proteína S12 40S ribosomal	gi 124504807	7	219
Proteína ribosomal L27, probable	gi 124810078	5	201
Proteína ribosomal I15	gi 124505451	5	198
Proteína hipotética, conservada	gi 124809152	2	169
Proteína ribosomal L7a	gi 124808774	4	157
Proteína hipotética, conservada PF08_0074	gi 124512500	4	131
Proteína de unión a RNA, probable	gi 86170571	2	120
Proteína hipotética, conservada	gi 124801947	1	108
14-3-3 Proteína	gi 3158460	1	104
Proteína hipotética PF10_0068	gi 124802073	1	88
Proteína hipotética MAL7P1.77	gi 124511866	1	87
Proteína hipotética PF11_0332	gi 124804437	1	82
Subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L)	gi 124809408	3	81
Proteína de unión a cadena sencilla, probable	gi 124506097	1	70
Proteína hipotética,	gi 124506647	2	70

conservada			
Proteína Lsm2 asociada al snRNA U6, probable	gi 124506327	2	62
Proteína ribosomal L13, probable	gi 124801997	1	55
Proteína nuclear relacionada con ras	gi 436408	2	52
Factor de iniciación 5a eucariótico, probable	gi 124805478	1	51
Proteína hipotética	gi 124513642	1	49
Homólogo de la proteína rica en serina	gi 160685	2	37
Factor multiproteico de unión tipo 1	gi 124804310	1	33

De todas estas proteínas identificadas por espectrometría de masas, solo 3 correspondieron a proteasas de *P. falciparum* y están indicadas en rojo en la tabla IV y se resumen en la tabla V.

Tabla V. Proteasas detectadas mediante espectrometría de masas.

Nombre	ID	Péptidos exclusivos	Mascot Score	Peso Molecular	Peso Molecular activa
Subunidad STP16 del complejo FACT, probable (FACT-L)	PF3D7_0517400	3	81	132.6 kDa	49.7 kDa
Aspártico Proteinasa (Plasmeppsina II)	PF3D7_140800	2	143	51.4 kDa	36.1 kDa
Proteína rica en serina (SERA 6)	PF3D7_0207500	2	37	118.8 kDa	26.6 kDa

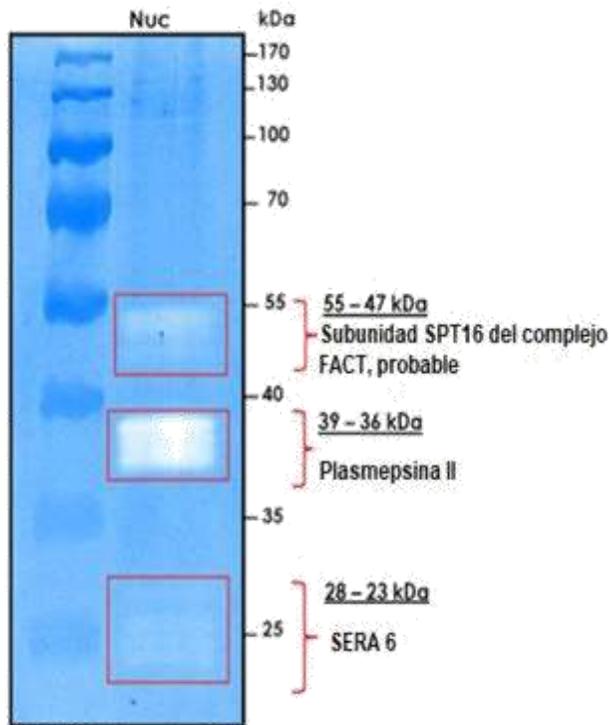


Figura 23. Representación esquemática de la región del gel en donde se identificaron a las tres proteasas nucleares: FACT-L, Plasmepsina II y SERA 6.

Ensayo de zimografía de los extractos nucleares asincrónicos, de donde se recuperaron las bandas que se enviaron a MS. Se identificaron 3 proteasas: La subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L) con un peso molecular predictivo de 49.7 kDa, Plasmepsina II con un peso molecular predictivo de 36.1 kDa y la proteína rica en serina (SERA 6) con un peso molecular predictivo de 26.6 kDa.

En la figura 23 se esquematiza en que banda se identificó cada una de estas tres proteasas, como se aprecia en esta figura al menos una de ellas fue identificada en cada una de las tres bandas y corresponden a metalo (subunidad SPT16 del complejo FACT, probable), aspártico (Plasmepsina II) y serín proteasa (SERA 6). Además las tres proteasas identificadas por MS, también fueron identificadas en nuestro análisis *in silico*.

Finalmente con la ayuda del programa **Motif Finder** (<https://www.genome.jp/tools/motif/>), el cual incorpora los datos de otros 3 programas de análisis de *motif* de proteínas como son: *Prosite*, *NCBI-DD* y *Pfam*, dando un análisis más amplio de los posibles motivos que puede tener una proteína. De esta manera se buscaron los dominios que

conforman a cada una de estas proteasas, para poder inferir el posible mecanismo de acción que pudieran estar realizando en el núcleo de este parásito. Para lo cual nos centramos en encontrar motivos de unión a DNA, histonas, chaperonas o factores de transcripción, esto con el propósito de inferir si estas proteasas podrían regular expresión de genes a nivel de cromatina o de factores de transcripción.

7.5.1 Subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L)

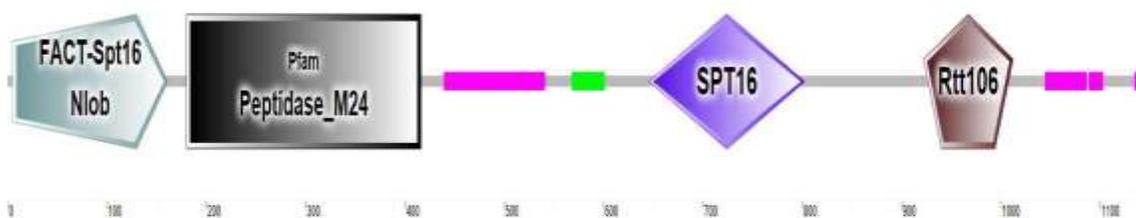


Figura 24. Representación esquemática de los dominios importantes de la proteasa subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L). Esta proteasa posee de forma predictiva 158 motivos, destacando, su motivo SPT16, el motivo de Peptidasa M24 y el motivo Rtt106.

La proteasa identificada en la banda 1 es la subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L). Esta proteína, es codificada por el gen FACT-L (ID: PF3D7_0517400), el cual tiene un tamaño de 3426 kbp, posee 3 exones y solo origina un transcrito. Esta proteasa pertenece a familia de las metalo proteasas (M24), su zimógeno tiene un tamaño de 132.6 kDa y posee un peso predictivo como proteasa activa de 49.7 kDa y de acuerdo a nuestros análisis *in silico* posee una NLS Bipartita a partir de la posición 1112 además de que expresa durante el estadio de esquizonte. De manera predictiva esta proteasa posee 158 motivos, entre los que destacan: su motivo SPT16 (factor de unión al nucleosoma), su dominio de peptidasa M24 y el motivo Rtt16 (chaperona de histona) como se aprecia en la figura 24.

7.5.1 Plasmepsina II (Aspártico proteasa)

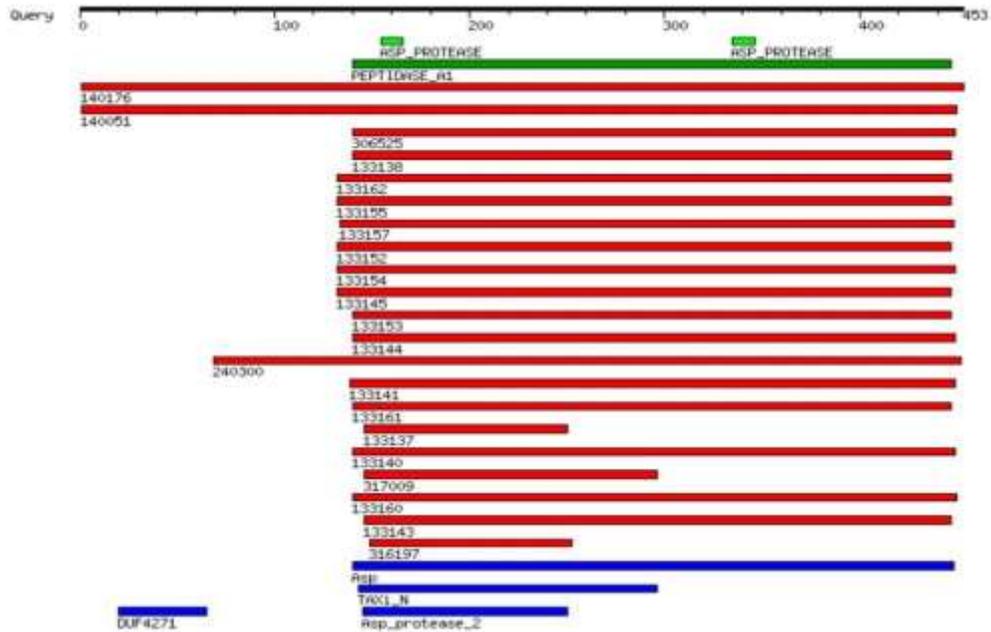


Figura 25. Representación esquemática de los dominios que conforman a la proteasa plasmepsina II. Esta proteasa posee de forma predictiva 27 motivos, destacando, su motivo de Aspártico proteasa (A1) y el motivo TAX1_N.

Otra proteasa que se identificó en la banda 2 es la Plasmepsina II, la cual es codificada por el gen PMII (ID: PF3D7_1408000), este gen tiene un tamaño de 1362 kbp, posee 1 exón y origina solo 1 transcrito. Esta proteasa, pertenece a la familia de las aspártico proteasas, posee un peso como zimógeno de 51.4 kDa y un peso predictivo como proteasa activa de 36.15 kDa, por nuestros análisis *in silico* posee una NLS Bipartita a partir de la posición 6. Además esta proteasa se expresa durante la fase de trofozoíto. De forma predictiva posee 27 motivos, los más conocidos son su motivo de Peptidasa A1 y su motivo *TAXi_N* (Inhibidor de Xylanasa N-terminal). Un esquema en donde se muestran los motivos que la constituyen se muestra en la figura 25

7.5.2 SERA 6 (Proteína rica en serina)

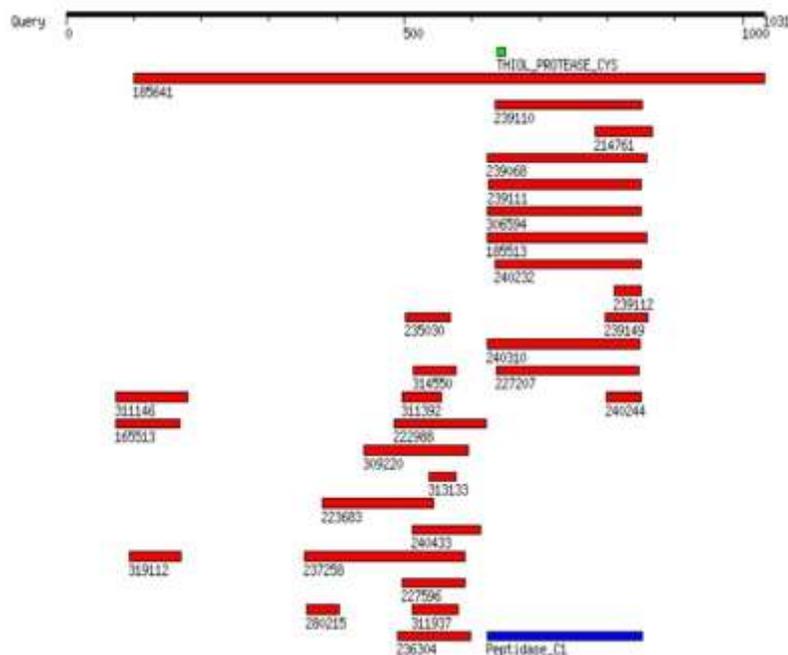


Figura 26. Representación esquemática de los dominios que conforman a la proteasa SERA 6. Esta proteasa posee de forma predictiva 31 motivos, destacando, su motivo de Tiol proteasa, su motivo relacionado a helicasas y el motivo SPT2.

Finalmente, en la banda 3 se encontró a la proteína SERA 6, la cual es codificada por el gen SERA 6 (ID: PF3D7_0207500), con un peso de 3096 kbp, este gen posee 3 exones y solo origina un transcrito. Esta proteasa, pertenece a familia de las cisteín proteasas, su zimógeno tiene un peso de 118.8 kDa y como proteasa activa posee un peso predictivo de 26.6 kDa. Nuestros análisis *in silico* muestran que posee una NLS Bipartita con inicio en la posición 364 y se expresa en los estadios de trofozoíto tardío – esquizonte temprano. De manera predictiva posee 31 motivos, los más relevantes son su motivo de proteasa tipo Tiol, su motivo relacionado a helicasas y su motivo SPT2 (proteína de cromatina) como se aprecia en la figura 26.

8. DISCUSIÓN

La malaria es una enfermedad devastadora, causada por patógenos del género *Plasmodium* y es *P. falciparum*, el causante de la mayor mortalidad ⁹¹. Desafortunadamente, la resistencia a la artemisinina (fármaco actualmente utilizado para combatir esta enfermedad) está emergiendo rápidamente. Por lo que existe la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos, en esta búsqueda las proteasas han surgido como blancos adecuados para el desarrollo de fármacos debido a que se conocen sus mecanismos enzimáticos y la estructura de sus sitios activos ^{92, 35}. Además de que las proteasas forman parte de un enorme grupo de enzimas que pertenecen a la clase de las hidrolasas, enzimas que se encargan de la ejecución de una reacción química común: la hidrólisis de los enlaces peptídicos ⁹³. Las proteasas se encuentran implicadas en diversos procesos celulares como son: modulan las interacciones proteína-proteína, contribuyen al procesamiento celular y en la apoptosis celular. Además, recientemente se ha demostrado su participación en procesos nucleares tales como replicación, transcripción, proliferación y diferenciación celular ⁹³. Esto ha sido sustentado ya que se ha demostrado que existen proteasas nucleares que participan en diferentes procesos celulares. Por ejemplo, el procesamiento de los extremos N-terminal de las histonas, en donde existen diferentes PTMs que al ser escindidas, esto repercute en los procesos celulares como: la diferenciación en células *stem cell* de ratón, esporulación en levadura y senescencia en fibroblastos ^{82, 83, 84}. Además de que también se ha documentado el procesamiento de factores de transcripción y proteínas nucleares, los cuales son llevados a cabo por proteasas presentes en el núcleo de estos organismos eucariotas ⁷². Un ejemplo ocurre con una proteasa del virus de la fiebre aftosa denominada 3C, la cual es capaz de procesar el extremo amino de la histona H3 y debido a que la forma trunca de la histona H3 sigue asociada a la cromatina se piensa que sea un requisito para reprimir la transcripción de la célula

huésped durante la infección viral por lo que de manera indirecta esta proteasa estaría regulando la transcripción de su célula huésped⁷⁹. Por otro lado, en rinovirus se reveló la existencia de la proteasa HRV2A, la cual es capaz de procesar a Nup62 (una nucleoporina), lo que conduce a un aumento en la permeabilidad de la envoltura nuclear⁸⁶. En *S. cerevisiae*, se encontró a una serín proteasa a la que denominaron endopeptidasa, responsable del procesamiento proteolítico del extremo N-terminal de la histona H3. De tal manera que esta histona H3 procesada regula la expresión de genes involucrados en el proceso de esporulación de levaduras⁸². Además en fibroblastos existe una isoforma corta de cisteín proteasa de la familia catepsina L, la cual procesa proteolíticamente al factor de transcripción CDP/Cux y el producto de este procesamiento es capaz de acelerar la transición de la fase G1 a S⁸⁵. Finalmente, usando modelos de senescencia inducida por oncogenes en fibroblastos se determinó que la catepsina L denominada CTSL1 es la encargada de procesar el extremo N-terminal de la histona H3 y que, esta forma corta de la histona H3 reprime la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular⁸⁴.

Todas estas evidencias indican que las proteasas nucleares juegan un papel ya sea directo o indirecto en regular diversos procesos biológicos en diferentes eucariotas y al parecer *P. falciparum* no es la excepción, ya que el grupo del Dr. Goldberg, en el año 2009, describió a la primera proteasa nuclear en este parásito. La cual es una cisteín proteasa perteneciente a la familia de las calpaínas. Sin embargo, esta es una calpaína atípica ya que carece del dominio IV (dominio de unión a calcio). Además esta calpaína contiene una secuencia de localización nuclear activa que le permite localizarse en el núcleo. El *knockdown* de Calpaína condujo a un defecto en el crecimiento de los parásitos de un 40-60% y morfológicamente, se observó un retraso en la transición de la etapa de anillo a trofozoito.

Asimismo, se encontró que la ausencia de esta calpaína tiene un impacto en la progresión del ciclo celular de la fase G1-S⁸⁹.

Además recientemente, se ha demostrado que ocurre un procesamiento del extremo N-terminal de la histona H3 en este parásito. Este procesamiento es llevado a cabo por la catepsina C (DPAP2) durante el estadio de esquizonte de *P. falciparum*. Ensayos tipo *ChIP* (*Chromatin immunoprecipitation assays*), revelaron que la histona H3 procesada se encuentra enriquecida en las regiones promotoras de genes implicados en la replicación e invasión de este parásito⁹⁰.

Tomando en cuenta lo anterior y considerando que este parásito, atraviesa por diferentes estadios de diferenciación durante su ciclo de vida y que el procesamiento proteolítico nuclear parece ser un mecanismo que tiene un papel importante, procedimos a averiguar en este trabajo si existen otras proteasas nucleares que regulen procesos biológicos durante el ciclo intraeritrocítico de este parásito.

Existen varias proteasas nucleares en *P. falciparum*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, nos permitieron demostrar la existencia de proteasas nucleares en *P. falciparum*. Esto se realizó en primer lugar mediante un análisis *in silico* que nos sugirió la presencia de otras proteasas nucleares, a partir de las 149 proteasas reportadas e identificar si alguna de ellas presentaba una secuencia de localización nuclear (NLS). Este análisis mostró que 58 de las 149 proteasas reportadas presentan una NLS (figura 13). De estas 37 presentan una NLS bipartita y el resto (21) una NLS monopartita, (tabla III). La presencia de una mayor cantidad de proteasas con una probable NLS bipartita nos llevó a preguntarnos si esto le confería alguna ventaja en caso de que fueran funcionales.

Hasta hoy se ha demostrado que existen sitios de unión presentes en las NLS que interactúan con segmentos de los dominios de las importinas (proteínas que ayudan al transporte de las proteínas al núcleo). Estos dominios están definidos por un residuo de lisina en la posición 2 (P2). En donde esta lisina P2 está estrictamente conservada en todas las NLS bipartitas caracterizadas estructuralmente lo que le da una interacción específica y extensa con los enlaces hidrogeno de la importina en esta posición. En cambio, en la NLS monopartita esta lisina en P2 no se encuentra conservada. Además un estudio encaminado a tratar de entender si el tamaño de la NLS era importante para su función mostró que las NLS significativamente más largas pueden tener mayor probabilidad de ser funcionales. Lo que sugiere que en una NLS bipartita los residuos que la conforman pueden aprovechar diferencialmente la superficie de la importina y mejorar su interacción con está⁹⁴. También mediante simulaciones informáticas se indicó que la tasa de importación de las proteínas depende fuertemente de la tasa de formación del complejo de importación (proteína-importinas), por lo que una interacción fuerte y específica sería indicativa de una segura importación nuclear⁹⁴.

Lo que nos lleva a hipotetizar, que entonces una NLS bipartita en una proteína tendrá una mayor especificidad de unión a su importina y por lo tanto esta proteína podría tener una mayor probabilidad de localizarse en el núcleo. Sin embargo, resta demostrar experimentalmente si realmente estas NLS son funcionales. El enfoque más común para probar si una NLS es funcional o no, es mutar uno o más residuos de la NLS consenso por alanina y determinar si la localización nuclear de la proteína disminuye o es nula. Típicamente la secuencia está fusionada al extremo de GFP y la ubicación de la proteína se evalúa por inmunofluorescencia. También pueden realizarse experimentos directos de unión *in vitro* con proteínas purificadas en presencia de RanGDP o RanGTP, los complejos de importación se encuentra disociados por RanGTP; por tanto, en estos

ensayos de unión la proteína de interés debería interactuar con su receptor de importación en presencia de RanGDP pero no en presencia de RanGTP. Otra forma de conocer si estas proteasas tienen una localización nuclear es mediante el sistema CRISPR/Cas9 agregando al gen endógeno que codifica para estas proteasas una etiqueta de HA. Esta etiqueta HA, nos permitirá realizar ensayos de inmunofluorescencia para verificar la localización nuclear.

Por otra parte, para corroborar experimentalmente la existencia de estas proteasas nucleares, procedimos a realizar ensayos de zimografía en geles copolimerizados con gelatina, utilizando un protocolo que nos permitió detectar la actividad proteolítica de las proteasas nucleares sobre la gelatina. Estos ensayos se efectuaron en un buffer a pH 7.5, ya que se ha determinado que el núcleo presenta este pH, lo cual favorecería principalmente la actividad proteolítica de las proteasas nucleares⁹⁶, (figura 18)

Finalmente estos ensayos nos permitieron observar actividad proteolítica de las proteasas presentes en los extractos nucleares que van de los 55 a los 23 kDa, (figura 19). Por lo que estos datos sugieren que existen varias proteasas nucleares en este parásito siendo la primera vez que empleando ensayos de zimografía se demuestra la existencia de estas proteasas en *P. falciparum*.

La forma activa de las proteasas nucleares ocurre principalmente en la etapa de anillo.

Debido a que este parásito posee tres fases de diferenciación durante su ciclo intraeritrocítico (anillo, trofozoíto y esquizonte) y para saber si estas proteasas poseen una actividad proteolítica estadio específico. Se realizaron ensayos de zimografía para cada uno de estos estadios, en donde observamos que en el estadio de anillos la actividad proteolítica de

los 55 a los 23 kDa se conserva y que esta actividad se va perdiendo conforme el parásito va madurando, observándose en el estadio de esquizontes solamente bandas proteolíticas en la zona de 25 a 23 kDa, (figura 20).

Este resultado fue un tanto inesperado ya que nosotros esperábamos que al realizar nuestros ensayos de zimografía con extractos nucleares obtenidos de parásitos en estadio de anillos, trofozoítos y esquizontes observáramos la mayor actividad proteolítica en nuestros geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina en la etapa de trofozoítos como lo sugería nuestro previo análisis *in silico*. Sin embargo, la mayor actividad proteolítica se observó en la etapa de anillos. Por lo que, para conciliar nuestros resultados con el análisis *in silico* creemos que la discrepancia estriba en que si bien estas proteasas se transcriben en trofozoítos, su traducción y procesamiento para obtener a la proteína activa ocurre posteriormente. Probablemente estas proteasas pueden ser traducidas como zimógeno en la etapa de trofozoíto, pero su procesamiento para tener la forma activa ocurre en esquizonte o propiamente en la etapa de anillos. Por lo que, para corroborar que efectivamente la forma activa de las proteasas identificadas ocurre en etapa de anillos. Primero deberíamos conocer de qué proteasas se trata al aislar las bandas de los geles de zimografía y mediante un análisis de MS identificarlas. Después podríamos generar anticuerpos contra estas proteasas, al obtener proteínas recombinantes. Estos anticuerpos se utilizarían en ensayos de WB en geles de zimografía utilizando extractos de los diferentes estadios del parásito lo que nos indicaría en que estadio esta proteasa se traduce (zimógeno) y en qué etapa presenta su actividad catalítica.

Las cisteín proteasas parecen ser una de las proteasas que tienen blancos nucleares

Por otro lado, la mayoría de las proteasas nucleares que se han reportado en eucariontes pertenecen a la familia de las cisteín proteasas, por ejemplo en células madre de ratón, células de erizo de mar y fibroblastos^{80, 81, 84, 85}. Además de que en *P. falciparum* las 2 proteasas identificadas (calpaína y DPAP2) hasta la fecha, pertenecen a esta familia de proteasas^{89, 90}. Lo que sugeriría que las cisteín proteasas son la única clase de proteasas nucleares. Sin embargo, en *S. cerevisiae* se ha reportado una serín proteasa la cual se encuentra regulando indirectamente la expresión de genes involucrados en el proceso de esporulación⁸². Por lo que entonces las proteasas nucleares no solo serían cisteín sino también serín proteasas; lo que abre la posibilidad que las proteasas nucleares puedan pertenecer a otras familias de proteasas. En este trabajo cuando se realizó el análisis *in silico* encontramos que las probables proteasas nucleares identificadas en *P. falciparum* pertenecen en su mayoría a la familia de las cisteín-serín y metalo proteasas (figura 13). Este dato fue corroborado experimentalmente mediante el uso de inhibidores para estas familias de proteasas, al emplear antipaína como inhibidor para la familia de las cisteín-serín proteasas, EDTA y bestatina para las metalo proteasas (figura 22). Nuestros resultados mostraron que la mayoría de las proteasas presentes en el núcleo de este parásito pertenecen a la familia de las cisteín y serín proteasas. Sin embargo, este resultado podría ser todavía más específico si se empleará el inhibidor E-64 que permitiría identificar a las cisteín proteasas. Mientras que el uso del inhibidor AEBSF podría identificar específicamente a las serín-proteasas. Además cabe mencionar que el protocolo que se utilizó para realizar los ensayos de zimografía permite evidenciar principalmente la actividad de las cisteín y serín proteasas. Por lo que para identificar otros tipos de proteasas se podrían utilizar protocolos de zimografía que permitieran detectar a los diferentes tipos de proteasas

reportadas. Para lo cual no solamente se ocupa a la gelatina como sustrato, sino que de acuerdo al tipo de proteasa es el sustrato a utilizar como por ejemplo: la caseína es un mejor sustrato para identificar a las serín y metalo proteasas. Para identificar a las metalo proteasas usualmente se emplea a la elastina o fibronectina⁹⁵. Además de utilizarse diferentes sustratos que se copolimerizan con la acrilamida también debe modificarse el buffer de actividad. Por ejemplo, para detectar la actividad de las metalo proteasas se puede agregar al buffer de actividad cloruro de calcio y cloruro de zinc; mientras que, para las aspártico proteasas se agrega citrato de sodio al buffer de actividad⁹⁶. Con esto se podría averiguar de manera más precisa los diferentes tipos de proteasas que hay en el núcleo de *P. falciparum*. Por lo que en base a nuestros resultados aún queda abierta la pregunta, de si en el núcleo de este parásito se encuentran proteasas pertenecientes a la familia de las metalo, aspártico y treonin proteasas.

Dos de las 3 proteasas identificadas parece que participan a nivel de transcripción en este parásito.

Finalmente, mediante MS identificamos 3 proteasas, a partir de las bandas de actividad proteolítica recuperadas de los geles de zimografía. En la primera banda correspondiente a la actividad de los 55 a 47 kDa, se identificó a la proteasa que presenta homología con la subunidad SPT16 del complejo FACT, (PfFACT-L). De acuerdo al programa *Motif Finder* esta proteína es una metalo proteasa con un peso molecular predictivo de 49.7 kDa para su forma activa. En la segunda banda que corresponden a proteínas que tuvieron una actividad proteolítica con un peso molecular de 39 a 36 kDa, se detectó a la plasmepsina II. El análisis *in silico* de esta secuencia indica que es una aspártico proteasa con un peso molecular predictivo de 36.15 kDa para su forma activa. Finalmente en la última banda correspondiente a la actividad que va de los 28 a 23 kDa se identificó a la proteasa SERA 6, una cisteín proteasa que posee un peso

molecular predictivo de 26.6 kDa para su forma activa, (figura 23). Cabe mencionar que estas 3 proteasas ya habían sido identificadas en nuestro *análisis in silico* (tabla III).

Posteriormente y para poder inferir la posible función que pudiera realizar cada una de estas proteasas en el núcleo de *P. falciparum*, se realizó un análisis de los diferentes dominios que conforman a cada una de estas proteínas con ayuda del programa **MotifFinder** (<https://www.genome.jp/tools/motif/>). Cuando realizamos este análisis nos centramos en identificar dominios de unión a DNA, histonas, chaperonas o factores de transcripción que de alguna manera nos permitiera averiguar si estas proteasas de manera directa o indirecta podrían participar en regular procesos biológicos importantes en este parásito.

PfFACT-L

Este análisis mostró que la proteasa SPT16, predictivamente posee 158 motivos, entre los que destacan: el dominio SPT16 (que le permite unirse al nucleosoma), su dominio de peptidasa M24 (metalo-proteasa) y el motivo Rtt106 (chaperona de histona⁹⁸). De acuerdo a lo reportado en la literatura SPT16 es una de las subunidades del complejo FACT (*FAcilitates Chromatin Transactions*)⁹⁷. FACT es una chaperona de histonas que está constituida por dos subunidades SPT16 y SSRP1 y en los primeros estudios *in vitro* se observó que su función de chaperona de histonas permite el desensamblaje de la estructura del nucleosoma, es decir, desplaza al dímero H2A/H2B durante el proceso de elongación para facilitar la transcripción⁹⁹.

Como mencionamos previamente el análisis de la proteína identificada como *SPT16-like* en el programa *Motif finder* reveló que la subunidad STP16 de FACT, consiste de: un dominio N-terminal (NTD) que muestra homología con metalo-peptidasas, un dominio de dimerización (DD)

mediante el cual se une a SSRP1 (Pob3), un dominio medio (MD) y un dominio C-terminal (CTD) que se requiere para unir a las histonas H2A/H2B *in vitro*⁹⁹, (figura 27).

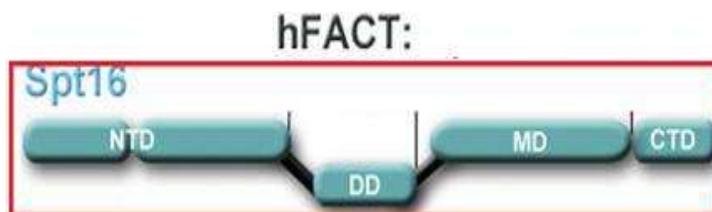


Figura 27. Representación esquemática de una de las subunidades que constituyen a FACT. En azul se muestran los dominios que constituyen a la subunidad SPT16.

El dominio C-terminal de SPT16 consiste en residuos ácidos intrínsecamente desordenados y la eliminación de estas regiones dificulta la capacidad de FACT para unir nucleosomas e histonas y para promover la transcripción⁹⁹.

Por lo que en base a lo antes mencionado, sugerimos que PfSPT16 podría participar en el desensamble de los nucleosomas al remover el dímero H2A/H2B.

En lo que respecta al dominio de homología con metaloproteasas que tiene PfSPT16 nosotros creemos que este dominio podría tener un papel importante durante el desensamble del nucleosoma y podría participar en romper los enlaces peptídicos que unen al dímero H2A/H2B con el tetrámero H3/H4 de los nucleosomas facilitando de esta manera que la chaperona pueda remover el dímero H2A/H2B.

Sin embargo, en qué punto la actividad proteolítica de la subunidad SPT16 sea requerida por FACT en este parásito es una pregunta que queda abierta, la cual podría ser elucidada mediante la generación de la proteína recombinante FACT-L que contenga el dominio catalítico e incubarla con

mononucleosomas si esta región es necesaria para el desensamble del dímero H2A/H2B nosotros deberíamos de ser capaces de recuperar ahora hexosomas o bien para saber si este dominio funciona como una endoproteasa podríamos modificar el dominio catalítico de este gen mediante el sistema CRISPR/Cas9 y checar si ahora esta proteína SPT16 ya no es capaz de disrumpir las interacciones entre las histonas H2A/H2B que constituyen al nucleosoma.

PfSERA 6

Nuestro análisis de MS identificó a la proteína rica en serina (SERA 6) la cual de acuerdo al análisis realizado en el programa *Motif Finder* posee 31 motivos de los cuales los más representativos son: su dominio de proteasa tipo TioI y un dominio STP2 (proteína de cromatina) (figura 25).

STP2, en eucariotas superiores es una proteína de unión a histonas y DNA, además de que promueve el ensamblaje de nucleosomas *in vitro*¹⁰⁰. En levadura se ha encontrado que SPT2 se une directamente al tetrámero de histonas H3/H4, interacción que es necesaria para el reciclaje de estas histonas posterior a la transcripción¹⁰¹. Además se sabe que SPT2, interacciona con otros factores de elongación como son: los complejos PAF y HIR / HPC¹⁰².

Todo esto ha llevado a proponer que STP2 tiene un papel importante en la mediación de la dinámica de la cromatina durante la elongación de la transcripción¹⁰³.

Por lo que especulamos que el dominio SPT2 de SERA6 podría estar involucrado en la remoción del tetrámero H3/H4, primero dividiendo este tetrámero en dímeros, posteriormente se uniría al conjunto libre de histonas y se mezclaría con nuevos dímeros H3/H4, y con ayuda de otras proteínas unirían nuevamente al tetrámero. O bien, que esta proteasa interactúe con los tetrámeros H3/H4 a través de su dominio STP2. Lo que conduciría al

desplazamiento del tetrámero del nucleosoma. De modo que la presencia de esta proteasa a través de su dominio STP2 facilite alteraciones en la estructura de la cromatina, induciendo algún cambio que afecte el proceso transcripcional de este parásito.

En lo que respecta a su dominio de proteasa tipo Tiol (cisteín proteasa) creemos que al igual que SPT16 ayudaría a romper los enlaces peptídicos que unen a los dímeros H2A/H2B del tetrámero para que posteriormente la chaperona SPT2 pueda remover al tetrámero de H3/H4.

Para poder dilucidar el papel que tiene esta proteasa, proponemos que mediante el sistema CRISPR/Cas9 modificar el dominio de proteasa y analizar si en ausencia de este dominio ocurre o no la disrupción del nucleosoma.

PfPlasmepsina II

Finalmente, la tercera proteasa identificada fue Plasmepsina II (figura 24), en la cual sus motivos más conocidos son: su motivo de peptidasa A1 y su motivo *TAXi_N* (Inhibidor de Xylanasa N-terminal).

Este motivo *TAXi_N*, en plantas y hongos juega un papel importante en la degradación de arabinoxilanos. Sin embargo, se desconoce su función en otros organismos eucariotas, por lo que no podríamos inferir si esta proteasa realiza alguna función a nivel de nuclear en este parásito. Ya que el papel mejor estudiado de esta proteasa en *P. falciparum* es su participación activa durante el proceso de degradación de hemoglobina en la VP de este parásito⁶¹. Sin embargo, el hecho de que esta proteasa sea citoplásmica no implica que no pueda ser transportada al núcleo. Esto es factible ya que en *P. falciparum*, se han descrito varias proteínas que tienen función tanto en el núcleo como en el citoplasma. Un ejemplo es la Sirtuina Sir2 de *P. falciparum*, la cual necesita ser sumoilada para poder trasladarse al núcleo del parásito, es decir tiene que ser modificada postraduccionalmente. Lo cual es posible ya que esta modificación

postraducciona se ha visto asociada con una variedad de funciones celulares entre ellas la ubicaci3n nuclear¹⁰⁴. Otro ejemplo es la actina I de *P. falciparum* la cual se localiza tanto en el citoplasma como en el n3cleo de este par3sito. En el citoplasma la actina I participa en los mecanismos de invasi3n y egreso de este par3sito^{56, 64}. Mientras que en el n3cleo, la actina I tiene un papel importante en reposicionar a los genes *var* de un compartimento represivo a uno activo, lo que es crucial para la expresi3n de estos genes y la patogenicia de *P. falciparum*¹⁰⁵.

Por lo que esto nos hace pensar que si bien el papel m3s conocido de esta proteasa sea en el citoplasma tambi3n a trav3s de una PTM esta proteasa podr3a ser transportada al n3cleo. Una manera de evaluar primero si esta proteasa se localiza en el n3cleo es etiquetando al gen end3geno con la bandera de GFP y mediante ensayos de inmunofluorescencia conocer si esta proteasa se encuentra en el n3cleo y mediante un anticuerpo anti-GFP hacer ensayos de co-inmunoprecipitaci3n para conocer sus substratos e inferir su funci3n.

Importaci3n de estas proteasas al n3cleo de *P. falciparum*

En eucariotas, el transporte de prote3nas del citoplasma al n3cleo y viceversa se lleva a cabo por difusi3n pasiva a trav3s del complejo del poro nuclear (NPC) qui3n permite un pasaje directo a trav3s de la envoltura nuclear cuando las prote3nas tienen un peso menor a 40kDa¹⁰⁶. Prote3nas con tama3os mayores a 40kDa no pueden difundir libremente hacia el n3cleo por lo que deben unirse a receptores espec3ficos de prote3nas para entrar o salir de este y ser transportadas activamente, requiriendo una se3al apropiada que les permita su importe y exporte. Esta se3al se conoce como secuencia de localizaci3n nuclear (NLS), la mayor3a de las se3ales de importe y exporte son reconocidas por la familia de β -karioferinas (kap), tambi3n conocidas como importinas y exportinas¹⁰⁷. Una vez que kap se ha

unido a su proteína cargo atraviesa el NPC, liberando su carga en el compartimiento de destinación y regresa por otra ronda. Debido a que este ciclo es direccional y se pueden acumular cargos en contra de un gradiente de concentración, una fuente de energía y direccionalidad son requeridas¹⁰⁸. Ambas están dadas por una Ran-GTPasa, la cual es controlada por dos reguladores, el factor de intercambio de nucleótidos Ran-Guanosina (RanGEF), y su alter ego, la proteína activadora Ran-GTPasa específica (RanGAP). Una vez que la kap ha dejado su carga en el núcleo, es transportado a través del NPC hacia el citosol. Aquí, Ran-GAP lo convierte en Ran-GDP. El receptor de importe queda listo para una nueva ronda de transporte hacia el núcleo¹⁰⁹. El exporte nuclear ocurre por un mecanismo similar, excepto que Ran-GTP en el núcleo promueve el exporte del receptor, en lugar de disociarlo. Una vez que el receptor de exporte se mueve a través del poro hacia el citosol, Ran-GTP se encuentra con Ran-GAP e hidroliza GTP. Como resultado, el receptor de exportación libera su cargo y Ran-GDP en el citosol. Los receptores de exporte una vez libres regresan al núcleo para completar el ciclo¹¹⁰. Estas NLS de acuerdo con los números de grupos de aminoácidos básicos dentro de ellas, se dividen en NLS monopartitas cuando contienen un único tramo de aminoácidos básicos que pueden consistir en al menos cuatro aminoácidos básicos consecutivos. Tradicionalmente la NLS monopartita tiene un consenso de K (K / R) X (K / R). Las NLS bipartitas tienen dos tramos de aminoácidos básicos separados por 10-12 aminoácidos y están representados por la secuencia de consenso (K / R) (K / R) X10-12 (K / R) 3/5 (X es cualquier aminoácido y (K / R) 3/5 representa los radicales libres de retiros de cinco aminoácidos consecutivos)¹¹¹.

De acuerdo a nuestro análisis *in silico*, estas proteasas identificadas todas poseen secuencias de localización nuclear bipartitas; SERA 6 posee su NLS a partir de la posición 364 (EIKVKAQDDFNPNEYKLIESIDNILSKIYK), Plasmepsina II tiene su NLS a partir de la posición 6 (REHDFKHGFIKSNSTFDGLNIDNSKNKKKIQ) y la Subunidad SPT16 del

complejo FACT, probable (FACT-L) posee su NLS a partir de la posición 1112 (RAKKDDKKRFAYKSDEDEDEGYNKRKKKKKN). Para saber si las NLS que presentan estas proteasas son funcionales podría colocarse una etiqueta de HA o GFP en su extremo amino o carboxilo en cada una de estas proteasas mediante el sistema de CRISPR-Cas9 y mediante inmunofluorescencia corroborar su presencia en el núcleo. También sería conveniente transfectar parásitos con cada una de estas proteínas a las cuales se les haya removido o mutado la NLS. Esperando que al no ser funcional esta NLS esta proteasa ya no fuera trasladada hacia el núcleo y mediante ensayos de inmunofluorescencia demostrar que como consecuencia de haberse mutado la NLS ahora la proteína solamente se ubica en el citoplasma. También mediante WB se podría corroborar su ausencia en nuestros extractos nucleares una vez que se haya mutado la NLS. Además proponemos que el importe y exporte de estas proteasas podría ser llevado a cabo por las importinas y exportinas de manera similar a como ocurre en otros eucariotas y como se ha descrito previamente. Creemos que esto es posible ya que en este parásito se ha identificado por análisis *in silico* importina (PF08_0087) y la importina (PF08_0069)¹⁰⁹. De tal modo, que si la NLS en cada una de estas proteasas fuera funcional, la importina podría reconocer esta NLS, la cual a su vez se asociaría a la importina formando un complejo que se trasladaría a través de la membrana nuclear hacia el núcleo.

Estas proteasas podrían funcionar como nuevos blancos terapéuticos para combatir a *P. falciparum*

Como ya lo hemos mencionado, las proteasas son un grupo de enzimas que han sido consideradas como nuevos blancos para el desarrollo de nuevas drogas antimaláricas

Por lo que nuestros resultados y tomando en cuenta que la proteína PfFACT-L posee una identidad del 37% con su homólogo SPT16 de

humano y que la proteína PfSERA6 posee una identidad del 25% con la catepsina S de humano; esto nos lleva a sugerir que estas dos proteínas podrían ser consideradas como moléculas candidato para el diseño de drogas contra uno de los parásitos que produce las más altas tasas de mortalidad en niños y adultos.

En conclusión en este trabajo se demostró la existencia en *P. falciparum* de varias proteasas nucleares principalmente cisteín-serín proteasas. Además se lograron identificar 3 probables proteasas nucleares, de las cuales FACT-L a través de su dominio SPT16 y SERA 6 a través de su dominio SPT2 probablemente tienen una participación importante en remodelar la cromatina durante la transcripción y una más Plasmepsina II cuya función es desconocida.

Por lo que este trabajo abre una nueva línea de investigación y nos sugiere funciones que no se han descrito para las proteasas en el núcleo. Además cabe la posibilidad de considerar a estas proteasas como candidatos para el desarrollo de una droga contra esta importante parasitosis.

9. CONCLUSIONES

- I. Existen varias proteasas en el núcleo de *P. falciparum* y estas proteasas en su mayoría pertenecen al tipo de las cisteín-serín proteasas
- II. La actividad de estas proteasas nucleares se observa de manera estadio-específico, siendo el estadio de anillos donde se observa la mayor actividad proteolítica.
- III. Se identificaron mediante espectrometría de masas (MS) 3 proteasas: la subunidad SPT16 del complejo FACT, probable (FACT-L), Plasmepsina II y la proteína rica en serina (SERA 6). Las cuales pertenecen a la familia de las metalo proteasas, aspártico proteasas y cisteín proteasas, respectivamente.
- IV. El análisis *in silico* de los dominios que conforman a cada una de estas proteasas sugieren que al menos dos de ellas (FACT-L a través de su dominio SPT6 y SERA 6 a través de su dominio SPT2) participan en modular la estructura de la cromatina durante la elongación de la transcripción al desensamblar a los nucleosomas, y que de esta forma podrían participar en regular procesos biológicos importantes durante el ciclo intraeritrocítico de este parásito.

10. PERSPECTIVAS

✓ Caracterización de una proteasa nuclear

- Para conocer la importancia de esta proteasa nuclear en *P. falciparum* proponemos realizar la caracterización de esta, mediante el sistema CRISPR/Cas9 agregando al gen endógeno una etiqueta de HA o GFP.
- Una vez etiquetado el gen endógeno (HA o GFP) se podría verificar la presencia de esta proteasa en el núcleo de *P. falciparum*, mediante ensayos de inmunofluorescencia.
- Para averiguar las posibles interacciones que pudiera tener esta proteasa nuclear o para saber si forma parte de un complejo proteico, se realizarán ensayos de Co-inmunoprecipitación que nos permitan conocer los substratos de esta proteasa.
- Para entender la función de esta proteasa nuclear en *P. falciparum*, desarrollar ensayos tipo *knock-down*, agregando un dominio desestabilizador al gen endógeno (DD) o bien obtener a la proteína recombinante y emplearla en los ensayos de actividad *in vitro*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Betanzos Reyes. (2011) Challenges and progress in the elimination of malaria in Mexico, *Bol Med Hosp Infant Mex* 68(2):159-168
2. Informe Mundial sobre el Paludismo 2017: resumen. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2017 (WHO/HTM/GMP/2017.4). Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
3. World Malaria Report (2017). Geneva: World Health Organization. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. Report on the situation of Malaria in the Americas, (2014) 978-92-75-11928-0
5. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. Alerta Epidemiológica: Aumento de casos de malaria, 15 de febrero de 2017, Washington, D.C. OPS/OMS. 2017
6. Programa de acción específico. Prevención y control del Paludismo 2013-2018. Programa Sectorial de salud. Secretaria de salud, consultado en http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/38348/PAE_PrevencionControlPaludismo2013_2018.pdf
7. Keeling, P.J. and Rayner, J.C. (2015). The origins of malaria: there are more things in heaven and earth. *Parasitology* 142:16–25
8. White J.N *et al.* (2014) Malaria *Lancet*; 383:723–35
9. Dasari P. *et al.* (2012) Pathogenesis of malaria revisited. *Med Microbiol Immunol* DOI 10.1007/s00430-012-0265-y
10. Sinden, R.E. (2015) The cell biology of malaria infection of mosquito: advances and opportunities. *Cell. Microbiol.* 17:451–466.
11. White NJ. (2011). Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J* 10:e297.
12. Tiburcio M. *et al.* (2015) Erythrocyte remodeling by *Plasmodium falciparum* gametocytes in the human host interplay. *Trends in Parasitology.* 31:6
13. Teun Bousema and Chris Drakeley (2011) Epidemiology and Infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Gametocytes in Relation to Malaria Control and Elimination. *Clinical Microbiology Reviews* 24;2:377–410
14. Boddey, J.A., and Cowman, A.F. (2013) *Plasmodium* nesting: remaking the erythrocyte from the inside out. *Annu Rev Microbiol.* 67:243–269.
15. Manual para la vigilancia y el control del paludismo en Mesoamérica Primera edición, (2008). Instituto Nacional de Salud Pública, México.
16. Srikanta B. and Puneet K.S. (2017) Malaria: An Update. *Indian J Pediatr* DOI 10.1007/s12098-017-2332-2.
17. Schumacher R. and Spinelli E. (2012) Malaria in Children. Review Article. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases.*
18. Kasper DL, *et al.* (2008) Harrison's principles of internal medicine, vol. 1. 7th ed. USA: McGraw-Hill p. 1280–93.
19. John C.J. Malaria (*Plasmodium*). In: Kliegman R, Nelson WE, editors. *Nelson textbook of Paediatrics*, vol. 1. 20th ed. Philadelphia: Elsevier/ Saunders; 2016. p. 1709–21.
20. Mangal P. *et al.* (2017) Analysis of the Clinical Profile in Patients with *Plasmodium falciparum* Malaria and Its Association with Parasite Density. *J Glob Infect Dis.* 9(2): 60–65. doi:10.4103/0974-777X.201626
21. Crawley J. *et al.* (2010) Malaria in children. *Lancet.* 375:1468–81.

22. Laishram D.D *et al.* (2012) The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria, *Malaria Journal*, 11:29
23. Protocolo de diagnóstico terapéutico – Malaria en pediatría 2014. Hospital Universitario Vall d’Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona.
24. Ugah U.I. *et al.* (2017) Evaluation of the utility value of three diagnostic methods in the detection of malaria parasites in endemic area. *Malaria Journal*. 16:189 DOI 10.1186/s12936-017-1838-4
25. Mark Travassos *et al.* (2016) Antimalarial drugs: An overview. UptoDate
26. Milner D. A. (2016) Pathogenesis of malaria. UptoDate
27. Jane Achan *et al.* (2011) Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10:144.
28. Coy D. Fitch. (2004) Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life Sciences* 74; 1957–1972.
29. Rubio E. (2017) Tesis: El tratamiento de la malaria.
30. Li J *et al.* (2010) Biological Actions of Artemisinin: Insights from Medicinal Chemistry Studies. *Molecules*, 15(3):1378-97
31. Klonis N. (2013) Iron and heme metabolism in *Plasmodium falciparum* and the mechanism of action of artemisinins. *Current Opinion Microbiol.* 16:722–727.
32. Hanafy M.I. *et al.* (2016) Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. *PNAS*, 113(8):2080-5.
33. Sinclair D. *et al.* (2009) Tratamientos con combinaciones basadas en la artemisinina para el paludismo no complicado. Disponible en: <http://www.cochrane.org/es/CD007483/tratamientos-con-combinaciones-basadas-en-la-artemisinina-para-el-paludismo-no-complicado>
34. Paloque L. *et al.* (2016) *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malaria Journal*, 15:1
35. Deu E. (2017) Proteases as antimalarial targets: strategies for genetic, chemical, and therapeutic validation. *The FEBS Journal* 284:2604–2628.
36. Edgington L. *et al.* (2011) Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate- and activity- based probes. *Curr Opin Chem Biol.* 15(6): 798–805. doi:10.1016/j.cbpa.2011.10.012.
37. Barrett, A.J., N.D. Rawlings and J.F. Woessner. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London.
38. Jakubke, H.D. (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*. In: UDENFRIEND, S. & MEIENHOFER, J. *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Academic Press Inc., New York, 9:103-165.
39. Vázquez A. *et al.* Ideas generales sobre activación de zimógenos. Disponible en: <https://previa.uclm.es/ab/educacion/ensayos/pdf/revista7/r7a23.pdf>
40. Barrett, A., N. Rawlings and J. Woessner (2004) Introduction. En: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press.
41. Schechter, I. and Berger A. (1967). On the size of the active site in proteases. Papain, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 27:157-62.
42. Rawlings N.D and Barret A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J.* 290 (Pt 1):205-18.
43. Rawlings, N.D., F.R. Morton and A.J. Barrett, (2006) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 34:D270-D272.
44. Di Cera E. (2009) Serine proteases. Critical review. *IUBMB Life*, 61(5): 510–515.

45. Stoka V. *et al.* (2005) Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis, critical review. *IUBMB Life*, 57(4/5): 347–353
46. Szecsi PB. (1992) The aspartic proteases. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 210:5-22.
47. Sieber S. (2010) Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology* Pages 629–674. Volume 9: Modern Methods in Natural Products Chemistry
48. Vallee, B.L. and Auld, D.S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry.* 29:5647-5659.
49. Bogoyevitch MA, Barr RK and Ketterman AJ. (2005) Peptide inhibitors of protein kinases—discovery, characterization and use. *Biochim Biophys* 1-2:79– 99
50. Zedlaczek, S.E. and Duggleby, R.G. (1995) Kinetics of slow and tight-binding inhibitors. *Meth. Enzymol.* 249: 144–180.
51. Sigma Aldrich – Protease inhibitors - <https://www.sigmaaldrich.com/mexico.html>
52. Jiang Y. *et al.* (2011) Serine protease inhibitor 4-(2aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) inhibits the rat embryo implantation in vivo and interferes with cell adhesion in vitro. *Contraception.* 84(6): 642-648.
53. Matsumoto K. *et al.* (1999) Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers (Peptide Science)*, 51:99–107
54. Cranton E. A textbook on EDTA chelation therapy, second edition. Foreword by Linus Pauling, PhD. Chapters 36-37.
55. Marciniszyn J. *et al.* (1976) Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin. *The journal of biological chemistry.* 251(22):7088-7094.
56. Cowman A. *et al.* (2017) Molecular basis of erythrocyte invasion by malaria parasites. *Cell Host & Microbe* 22:232-245
57. Riglar D. *et al.* (2011) Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host & Microbe* 9:9– 20.
58. Bake R. *et al.* (2006) Two Plasmodium Rhomboid Proteases Preferentially Cleave Different Adhesins Implicated in All Invasive Stages of Malaria. *PLoS Pathog* 2(10): e113. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020113
59. Silmon de Monerri NC, *et al.* (2011) Global identification of multiple substrates for Plasmodium falciparum SUB1, an essential malarial processing protease. *Infect Immun* 79:1086–1097.
60. O'Donnell RA, *et al.* (2006) Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J Cell Biol* 174: 1023–1033.
61. Liu J, Gluzman IY, Drew ME and Goldberg DE. (2005) The role of *Plasmodium falciparum* food vacuole plasmepsins. *J Biol Chem* 280:1432–1437.
62. Shenai BR, Sijwali PS, Singh A and Rosenthal PJ (2000) Characterization of native and recombinant falcipain2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 275: 29000–29010.
63. Klemba, M. *et al.* (2004) A *Plasmodium falciparum* Dipeptidyl aminopeptidase I participates in vacuolar hemoglobin degradation. *J. Biol. Chem.*, 279:43000-43007

64. Wirth C. *et al.* (2012) Molecular mechanisms of host cell egress by malaria parasites. *International Journal of Medical Microbiology*. 302:172-178
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.003>
65. Yeoh, S. *et al.* (2007) Subcellular discharge of a serine protease mediates release of invasive malaria parasites from host erythrocytes. *Cell* 131:1072–1083
66. Arico-Muendel C. *et al.* (2009) Antiparasitic activities of novel, orally available fumagillin analogs. *Bioorg Med Chem Lett* 19:5128– 5131.
67. Li H, *et al.* (2014) Assessing subunit dependency of the Plasmodium proteasome using small molecule inhibitors and active site probes. *ACS Chem Biol* 9:1869–1876.
68. Ng L. *et al.* (2017) Protein degradation systems as antimalarial therapeutic targets. *Trends in Parasitology*. 33(9):731-743
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.05.009>
69. Mordmuller, B. *et al.* (2006) Plasmodia express two threonine-peptidase complexes during asexual development. *Mol. Biochem. Parasitol.* 148:79-85
70. Ramasamy, G. *et al.* (2007) Characterization and localization of plasmodium falciparum homolog of prokaryotic ClpQ/HsIV protease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152:139-148.
71. Luger K., *et al.* (2012) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Bio* 13(7):436–447. doi:10.1038/Nrm3382
72. Azad G. *et al.* (2014) Proteolytic clipping of histone tails: the emerging role of histone proteases in regulation of various biological processes. *Mol Biol Rep* 41:2717–2730 DOI 10.1007/s11033-014-3181-y
73. Lin R, Cook RG and Allis CD. (1991) Proteolytic removal of core histone amino termini and dephosphorylation of histone H1 correlate with the formation of condensed chromatin and transcriptional silencing during Tetrahymena macronuclear development. *Genes Dev* 5(9):1601–1610
74. Tsurugi K. and Ogata K. (1986) Effects of DNA and urea on the specificity for H1 histone of the neutral protease B partially purified from rat liver chromatin. *J Biochem* 99(1):237–241
75. Kaul R, *et al.*, (1997) The chlamydial EUO gene encodes a histone H1-specific protease. *J Bacteriol* 179(18):5928–5934
76. Eickbush TH, *et al.* (1976) A chromatin-bound proteolytic activity with unique specificity for histone H2A. *Cell* 9(4/2):785–792
77. Panda P, *et al.* (2013) Purification and characterization of a novel histone H2A specific protease (H2Asp) from chicken liver nuclear extract. *Gene* 512(1):47–54. doi:10.1016/j.gene.2012.09.098
78. Brandt WF. and Von Holt C. (1975) Isolation and characterization of the histones from cycad pollen. *FEBS Lett* 51(1):84–87
79. Tesar M, Marquardt O. (1990) Foot-and-mouth disease virus protease 3C inhibits cellular transcription and mediates cleavage of histone H3. *Virology* 174(2):364–374
80. Morin V, *et al.*, (2008) Cathepsin L inhibitor I blocks mitotic chromosomes decondensation during cleavage cell cycles of sea urchin embryos. *J Cell Physiol* 216(3):790–795. doi:10.1002/jcp.21459
81. Duncan EM, *et al.* (2008) Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* 135(2):284–294. doi:10.1016/j.cell. 2008.09.055

82. Santos-Rosa H, *et al.* (2009) Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 16(1):17–22. doi:10.1038/nsmb.1534
83. Purohit JS, *et al.* (2013) Chicken liver glutamate dehydrogenase (GDH) demonstrates a histone H3 specific protease (H3ase) activity in vitro. *Biochimie* 95(11):1999–2009. doi:10.1016/j.biochi.2013.07.005
84. Duarte LF. *et al.* (2014) Histone H3.3 and its proteolytically processed form drive a cellular senescence programme. *Nat Commun.* 5: 5210.
85. Goulet B. *et al.* (2004) A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and process the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell.* 23;14(2):207-19.
86. Park N. *et al.* (2010) Specific cleavage of the nuclear pore complex protein Nup62 by a viral protease. *J Biol Chem.* 285(37):28796-805. doi: 10.1074/jbc.M110.143404.
87. Duffy, M.F, *et al.* (2012) The role of chromatin in *Plasmodium* gene expression. *Cell. Microbiol.* 14:819–828.
88. Doerig, C. *et al.* (2015) Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:160–172.
89. Russo, I. *et al.* (2009) A calpain unique to alveolates is essential in *Plasmodium falciparum* and its knockdown reveals an involvement in pre-S-phase development. *PNAS*, 6(5):1554-1559
90. Herrera-Solorio M.A, *et al.* (2013) Cathepsin C-like protease regulates DNA replication by histone H3 N-terminal clipping in malaria parasites.
91. Miller L. *et al.* (2013) Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med.* 19(2):156–167. doi:10.1038/nm.3073.
92. Burrows JN. *et al.* (2011) The state of the art in anti-malarial drug discovery and development. *Curr Top Med Chem.* 11:1226–1254.
93. López-Otín C. and Bond S.J. (2008) Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *The Journal of Biological Chemistry* 283(45):30433–30437.
94. Marfori M. *et al.* (2011) Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1813(9):1562-1577
95. Toth M and Fridman R. (2001) Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. *Methods Mol Med.* 57:163-74. doi: 10.1385/1-59259-136-1:163.
96. Wilkesman J and Kurz L. (2017) Zymography – Methods and Protocols. *Springer Protocols.* ISBN 978-1-4939-7109-1 DOI 10.1007/978-1-4939-7111-4.
97. Formosa T. (2012) The Role of FACT in Making and Breaking Nucleosomes. *Biochim Biophys Acta.* 1819(3-4): 247–255. doi:10.1016/j.bbagr.2011.07.009.
98. Liu Y, *et al.* (2010) Structural analysis of Rtt106p reveals a DNA binding role required for heterochromatin silencing. *J Biol Chem.* 285:4251–4262. [PubMed: 20007951]
99. Winkler D.D and Luger K. (2011) The Histone Chaperone FACT: Structural Insights and Mechanisms for Nucleosome Reorganization. *The Journal of Biological Chemistry.* 286(21):18369–18374
100. Novoseler M, *et al.* (2005) Functional Domains of the Yeast Chromatin Protein Sin1p/Spt2p Can Bind Four-way Junction and Crossing DNA Structures. *The Journal Of Biological Chemistry.* 280(7):5169–5177

101. Osakabe A, *et al.* (2012) Vertebrate Spt2 is a novel nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription. *Journal of Cell Science* 126:1323–1332. doi: 10.1242/jcs.112623
102. Chen S. *et al.* (2015) Structure–function studies of histone H3/H4 tetramer maintenance during transcription by chaperone Spt2. *Genes & Development* 29:1326–1340 Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISSN 0890-9369/15
103. Lefebvre L and Smith M. (1993) Mutational and Functional Analysis of Dominant SPT2 (SINJ) Suppressor Alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular Biology*. 13(9):5393-5407.
104. Issar N. *et al.* (2008) Identification of a novel post-translational modification in *Plasmodium falciparum*: protein sumoylation in different cellular compartments. *Cellular Microbiology* 10(10):1999–2011 doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01183.x
105. Zhang Q. *et al.* (2011) A Critical Role of Perinuclear Filamentous Actin in Spatial Repositioning and Mutually Exclusive Expression of Virulence Genes in Malaria Parasites. *Cell host and microbe*. 10(5):451-463 doi: 10.1016/j.chom.2011.09.013.
106. Frankel MB and Knoll LJ. (2009) The ins and outs of nuclear trafficking: unusual aspects in apicomplexan parasites. *DNA Cell Biol*. 28:277-284.
107. Hahn S, *et al.* (2008) Classical NLS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 379:678–694 doi:10.1016/j.jmb.2008.04.038
108. Tran EJ, *et al.* (2007) SnapShot: nuclear transport. *Cell* 131:420. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.015>.
109. Yoneda Y, *et al.* (1999) Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran. *Cell structure and function* 24:425-433
110. Markina-Inarrairaegui A, *et al.* (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 22:3874–3886. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0262>.
111. Structural Basis of Interaction of Bipartite Nuclear Localization Signal from *Agrobacterium* VirD2 with Rice Importin- α . (2014) *Molecular Plant*, 7(6):1061–1064.