

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“Identificación *in silico* de los canales de calcio en *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma brucei*”

Realizado por:

BRYAN MARTIN AYALA LUNA

Director del proyecto:

PhD. Graciela Uzcanga

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 8 de Febrero del 2018

32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

DECLARACION JURAMENTADA

Yo, BRYAN MARTIN AYALA LUNA, con cédula de identidad # 172155418-4, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA Y CEDULA
172155418-4

58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“Identificación *in silico* de los canales de calcio en *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma brucei*”

Realizado por:

BRYAN MARTIN AYALA LUNA

Como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por la profesora

GRACIELA UZCANGA

Quien considera que constituye un trabajo original de su autor



FIRMA

84

85

LOS PROFESORES INFORMANTES

86

Los Profesores Informantes:

87

88

89

PABLO CASTILLEJO

90

91

92

LINO ARISQUETA

93

94

95

Después de revisar el trabajo presentado,

96

lo han calificado como apto para su defensa oral ante

97

el tribunal examinador

98

99

100



FIRMA

101

102

103

104

105

106

107

108



FIRMA

QUITO, 8 Febrero del 2018

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

DEDICATORIA

120

Dedicado a mis padres.

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

AGRADECIMIENTO

145

A mis profesores por impartirme sus amplios y bastos conocimientos, a mis amigos,
a mi novia y familiares por el apoyo brindado en este ciclo muy importante de mi vida.

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

15/2/18 6:12:25 a.12.p.12.

159

160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190

To be submitted to: *Mathematical Biology and Bioinformatics*

**Identificación *in silico* de los canales de calcio en *Leishmania mexicana* y
*Trypanosoma brucei***

Identification *in silico* of calcium channels in *Leishmania mexicana* and
Trypanosoma brucei

Bryan Martin Ayala & Graciela Uzcanga

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador.
Email: brianayala@live.com, graciela.uzcanga@uisek.edu.ec

- Autor de correspondencia: PhD. Graciela Uzcanga, graciela.uzcanga@uisek.edu.ec

Titulo corto: Identificación de canales de calcio

191 **Resumen.**

192

193 *Trypanosoma brucei* y *Leishmania mexicana* son parásitos protozoarios pertenecientes a la familia
194 kinetoplastidae trypanosomatidae, estos afectan directamente a humanos y en algunos casos a
195 animales. Según la organización mundial de la salud *L. mexicana* afecta alrededor de 12 millones de
196 personas en 98 países por otro lado *T. brucei* afecta a millones de personas en 36 países del
197 continente africano, y estas se encuentran asocia directamente con la pobreza. (Iowa State
198 University/College of Veterinary Medicine, 2009).

199

200 Se ha descubierto la presencia de canales de calcio en estos parásitos que intervienen en su vida
201 molecular y celular. Un canal de calcio es un canal de iones que muestra una permeabilidad
202 selectiva a los iones de calcio, basado en varios estudios realizados que han confirmado su
203 veracidad, ya han localizado un tipo de canal de calcio que es el tipo L (Ruiz-Postigo, Franco, Lado,
204 & Simarro, 2012). Con el presente trabajo de investigación se pudo identificar un nuevo canal de
205 calcio homólogo al identificado de la planta (*Ananas comosus*) la cual posee el dominio DUF221
206 que codifica para el canal de calcio tipo P, la cual encontramos tanto en *Leishmania mexicana*
207 como en *Trypanosoma brucei* que son los parásitos de estudio.

208

209 Para *Leishmania mexicana* se identificaron 8 posibles regiones transmembrana mientras que para
210 *Trypanosoma brucei* se identificaron 11 posibles regiones transmembrana y en los dos parásitos un
211 posible dominio de unión a Calmodulina.

212

213 **Palabras clave:** *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei*, Canales de Calcio, Vectores.

214

215

216

217

218 **Abstract.**

219

220 *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* are protozoan parasites belonging to the family
221 kinetoplastidae trypanosomatidae, these directly affect humans and in some cases animals.
222 According to the world health organization *L. Mexican* affects around 12 million people in 98
223 countries. On the other hand, *T. brucei* affects millions of people in 36 countries of the African
224 continent, and these are directly associated with poverty. (Iowa State University / College of
225 Veterinary Medicine, 2009).

226

227 It has been discovered the presence of calcium channels in these parasites involved in molecular and
228 cellular life. A calcium channel is an ion channel that shows a selective permeability to ions of
229 calcium, based on several studies that have confirmed their veracity, have already located a channel
230 type of calcium which is the type L (Ruiz-Postigo, Franco, Hand, & Simarro, 2012). With this
231 research work we were unable to identify a new channel of calcium counterpart to the identified the
232 plant (*Ananas comosus*) which owns the domain name DUF221 coding for the P-type calcium
233 channel, which we find both in *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* that are parasites of
234 study.

235

236 For *Leishmania mexicana* 8 were identified possible transmembrane regions while for
237 *Trypanosoma brucei* identified 11 potential transmembrane regions and in the two parasites a
238 calmodulin-binding domain.

239

240 **Key words:** *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma brucei*, Calcium Channels, Vectors.

INTRODUCCIÓN

241

242

243 La Leishmaniasis es una enfermedad transmitida por vectores protozoarios, que afecta tanto a
244 humanos como a animales. Puede ser causado por muchas especies de *Leishmania*. Algunos de
245 estos organismos se mantienen principalmente en humanos, pero la mayoría circula principalmente
246 en animales, la mayoría de estos últimos organismos son zoonóticos (Boelaert, 2000).

247

248 El ciclo de vida de esta y otras especies de *Leishmania* comienza cuando un flebotomino infectado
249 muerde e inyecta promastigotes en la piel del huésped mamífero, esos promastigotes están
250 engullidos por las células fagocíticas, como los macrófagos y las células dendríticas. Los parásitos
251 se mantienen dentro de una vacuola parasitofórica, luego se transforman en amastigotes y se dividen
252 hasta formar la membrana celular, se liberan para infectar nuevas células como estadio de
253 amastigotes (Winter, et al, 1994).

254

255 La *Leishmania* puede causar lesiones en la piel y las mucosas, la mayoría de las especies de
256 *Leishmania* se mantienen en la vida silvestre, a menudo sin signos clínicos (Iowa State
257 University/College of Veterinary Medicine, 2009). Los casos clínicos presentados en esta especie
258 pueden ser mortales y pueden ser difíciles de tratar. Los casos de Leishmaniasis también se
259 observan ocasionalmente en cobayas, gatos, équidos y especies silvestres cautivas o de vida libre, el
260 ganado rumiante rara vez se ve afectado. *Leishmania mexicana* es un parásito protozoario
261 intracelular obligado que causa la forma cutánea de la Leishmaniasis, esta especie de *Leishmania* se
262 encuentra en América con mayor incidencia de casos en México y América Central.

263

264 *L. mexicana*, puede inducir las manifestaciones clínicas cutáneas y cutáneas difusas en humanos, el
265 tipo cutáneo desarrolla una úlcera en el lugar de la mordedura, aquí los amastigotes no se diseminan
266 y las úlceras se vuelven visibles unos días o varios meses después de la mordida inicial, el tipo

267 cutáneo difuso comienza cuando el amastigote se difunde a través de la piel y se transforma en
268 metástasis a otros tejidos (Vera-izaguirre, et al, 2006; Reithinger et al., 2007).

269
270 Según el reporte de la organización mundial de la salud *Leishmania sp.* se ha reportado en 88 países
271 de los cinco continentes: África, Asia, Europa, América del Norte y América del Sur (22 en el
272 Nuevo Mundo y 66 en el Viejo Mundo), 16 son países desarrollados, 72 están en desarrollo y 13 de
273 ellos están entre los menos desarrollados, aproximadamente 350 millones de personas corren el
274 riesgo de contraer esta enfermedad y 20 millones de personas están infectadas en todo el mundo, y
275 se estima que 2.0 millones de casos nuevos ocurren cada año, en la mayoría de los casos los
276 pacientes no se acogen a un curso completo de tratamiento debido al costo, la disponibilidad, ruta
277 invasiva de administración, y la larga duración del tratamiento, lo cual, a su vez, aumenta el riesgo
278 de mortalidad (Boelaert, 2000).

279
280 En Ecuador, se reportaron 1724 casos por año de Leishmaniasis cutánea entre el 2004 y el 2008. En
281 Ecuador, según los datos Ministerio de Salud Pública (2015), durante el año 2013 se registraron 829
282 casos, 1161 en el año 2014 y en el año 2015 se registraron un total de 1401 casos de Leishmaniasis
283 (Ministerio de Salud Pública, 2016).

284
285 La Leishmaniasis y Trypanosomiasis son enfermedades transmitidas por 90 diferentes especies
286 insectos (phlebotomus y moscas). La tripanosomiasis africana humana, también conocida como
287 enfermedad del sueño, es una enfermedad parasitaria transmitida por vectores que infectan a
288 *Trypanosoma brucei*, que son parásitos protozoarios pertenecientes a la familia kinetoplastidae
289 trypanosomatidae. Se transmiten a los humanos por picaduras de la mosca tse-tsé (*Glossina* genus)
290 que han adquirido su infección de seres humanos o de animales que albergan a los parásitos
291 patógenos (Brun & Balmer, 2006).

292 El ciclo de infección de esta enfermedad es el siguiente: 1. una mosca tse-tsé infectada (género
293 Glossina) inyecta trypomastigotes metacíclicos en el tejido de la piel. El parásito ingresa al sistema
294 linfático y pasa al torrente sanguíneo, 2. Dentro de la célula hospedadora, se transforman en
295 trypomastigotes del torrente sanguíneo, 3. Se lleva a otros sitios en todo el cuerpo, alcanzan otros
296 fluidos sanguíneos (por ejemplo, linfa, fluido espinal) y continúan la replicación mediante fisión
297 binaria. Este ciclo toma alrededor de 3 semana en infectar al organismo (Golding, 2013).

298

299 La enfermedad del sueño amenaza a millones de personas en 36 países del continente africano.
300 Muchas de las poblaciones afectadas viven en áreas remotas con acceso limitado a servicios de
301 salud adecuados, lo que obstaculiza la vigilancia y, por lo tanto, el diagnóstico y el tratamiento de
302 los casos (Abenga, 2014). Además, el desplazamiento de las poblaciones, la guerra y la pobreza son
303 factores importantes que conducen a un aumento de la transmisión y esto altera la distribución de la
304 enfermedad debido a sistemas de salud debilitados o inexistentes.

305

306 Mientras que *T. brucei* afecta a las poblaciones de África que viven en áreas remotas con acceso
307 limitado a servicios de salud adecuados, lo que obstaculiza la vigilancia y, por lo tanto, el
308 diagnóstico y el tratamiento de los casos una de las complicaciones más graves para el estudio de
309 esta enfermedad (Abenga, 2014). Algunos de los medicamentos utilizados para el tratamiento tienen
310 efectos secundarios significativos o disponibilidad limitada fuera de las regiones endémicas (Vera-
311 izaguirre, Vega-memije, Quintanilla-cedillo, & Arenas, 2006).

312

313 Para tratar la nombrada enfermedad del sueño causado por el parásito *T. brucei* incluyen los
314 siguientes medicamentos: Eflornitina (únicamente para *T. brucei gambiense*), Melarsoprol,
315 Pentamidina (únicamente para *T. brucei gambiense*), Suramina (Antrypol), en algunos casos se

316 utiliza la administración de dos medicamentos al mismo tiempo, esta enfermedad sin tratamiento
317 lleva a la muerte en semanas e inclusive con él (Bonnet, Boudot, & Courtioux, 2015).

318

319 Los medicamentos de primera elección que se suministran a los pacientes, una vez diagnosticados
320 con leishmaniasis mediante la evidencia de los amastigotes intracelulares en muestras de la lesión,
321 son sales de antimonio pentavalente (Sb5+), como el Glucantime y el estibogluconato de sodio
322 (Pentostam®). Ambas formulaciones presentan eficacia similar y se administran para tratar
323 cualquiera de las tres formas clínicas de la enfermedad (cutánea, visceral y mucocutánea) (Winter,
324 Fuchs, McConville, Stierhof, & Overath, 1994). El índice de cura es alentador con los
325 medicamentos apropiados y diagnosticado a tempranas etapas del desarrollo de estas enfermedades.

326

327 En el Ecuador los casos clínicos de la Leishmaniasis han generado la necesidad de nuevos métodos
328 de tratamiento y el uso de tecnologías recientes para buscar y desarrollar nuevos agentes
329 quimioterapéuticos que sean fácilmente disponible y al alcance de la población afectada.
330 Anualmente, Ecuador gasta miles de dólares en suministrarles el tratamiento a los pacientes con
331 Leishmaniasis, específicamente el país invierte en la compra de Glucantime (Ministerio de Salud
332 Pública, 2016).

333

334 Debido a la falta de interés comercial, pocos medicamentos nuevos se están desarrollando o se
335 introducen en contra de Leishmaniasis. A la fecha tampoco no se han desarrollado vacunas eficaces
336 y el control de la Leishmaniasis se basa principalmente en la quimioterapia.

337

338 Las estrategias actuales para controlar y contrarrestar esta enfermedad se basan principalmente en el
339 uso de la quimioterapia, la cual se basa en el uso de pocos medicamentos, incluidos los derivados
340 antimoniales. Las principales causas que hace que su utilización sea limitada es el alto costo del

341 tratamiento, la elevada toxicidad, la administración parenteral y la aparición de resistencia. Teniendo
342 en cuenta las pocas opciones terapéuticas y la falta de interés del sector privado, es evidente la
343 necesidad de nuevos fármacos (Boelaert, 2000).

344

345 Algunos tratamientos en contra de la Leishmaniasis afectan la corriente de calcio del parásito. El
346 calcio desempeña un papel crucial en diferentes vías fisiológicas, bioquímicas y de señalización en
347 células animales y vegetales, además el calcio es uno de los segundos mensajeros más extendidos
348 que participan en varias transducciones de señales. Los orgánulos intracelulares, como las
349 mitocondrias y el retículo endoplásmico, son el almacén de calcio; constantemente se acumulan y
350 liberan calcio durante ciertos eventos celulares para mantener la homeostasis del calcio (Hoppe,
351 Brandt, Michels, & Lindner, n.d.). Los iones de calcio ingresan al citoplasma desde afuera de la
352 célula a través de los canales de calcio de la membrana celular o desde algunos depósitos internos de
353 calcio como el retículo endoplásmico y la mitocondria (Navarro & Lozano, 2016). Un canal de
354 calcio es un canal de iones que muestra permeabilidad selectiva a los iones de calcio, en ocasiones
355 también es un canal de calcio dependiente del voltaje, aunque también hay canales de calcio
356 controlados por ligandos (Tyson & Snutch, 2013).

357

358 Los bloqueadores de los canales de calcio (BCC) son una clase de medicamentos que actúan
359 inhibiendo selectivamente la afluencia de calcio a través de las membranas celulares, se encuentran
360 entre los fármacos más utilizados en la medicina cardiovascular con funciones no solo en la
361 hipertensión, sino también en la angina y (para algunos CCB) taquiarritmias (Reimão, et al, 2016).
362 Aunque a menudo se consideran como una clase única, los BCC dependiendo de la estructura
363 química se pueden subdividir en los siguientes grupos: dihidropiridinas (por ejemplo, nifedipina,
364 nimodipina y amlodipina), las benzotiazepinas (por ejemplo, diltiazem) y fenilalquilaminas (por
365 ejemplo, verapamilo) (Reimão, Mesquita, Ferreira, & Tempone, 2016).

366 Las dihidropiridinas se han considerado exitosos antiparasitarios prometedores, especialmente
367 contra los parásitos protozoarios. La eficacia oral in vivo de amlodipina y lacidipina se ha
368 demostrado en el tratamiento de ratones infectados con *Leishmania (L.) donovani* (Tyson & Snutch,
369 2013). Se demostró la actividad antiparasitaria *in vitro* de ocho dihidropiridinas utilizadas
370 clínicamente (azelnidipina, amlodipina, cilididipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina,
371 nimodipina y nitrendipina) frente a un panel de especies de *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma*
372 *brucei* (Reimão et al., 2016).

373

374 El calcio se mantiene estrictamente en los compartimentos celulares mediante la coordinación de
375 varias bombas y canales de Ca^{2+} . Dos de tales bombas de calcio fundamentales son la ATPasa
376 cálcica de membrana plasmática (EPCP) y la ATPasa de calcio del retículo endoplásmico / sarco
377 (SERCA), que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento del homeostasis del calcio
378 intracelular, esta homeostasis intracelular de Ca^{2+} a menudo es perturbada por el parásito
379 protozoario *Leishmania mexicana*, causante de manifestaciones cutáneas y cutáneas difusas (Perez-
380 reyes & Schneider, 1994).

381

382 Los mecanismos de regulación del metabolismo mitocondrial en los tripanosomas no se conocen
383 por completo, se presenta el tripéptido de calcio mitocondrial (aminoácido que liga calcio en la
384 mitocondria) *Trypanosoma brucei* (TbMCU) es esencial para la regulación de la bioenergética
385 mitocondrial, la autofagia y la muerte celular, incluso en las formas del torrente sanguíneo que
386 carecen de una cadena respiratoria funcional y la fosforilación oxidativa. La sobreexpresión de
387 (TbMCU) aumenta la acumulación mitocondrial de Ca^{2+} en tripanosomas intactos y
388 permeabilizados, genera especies excesivas de oxígeno mitocondrial reactivo (ROS) y los
389 sensibiliza a estímulos apoptóticos. (Morrison, 2011).

390

391 Las evidencias fisiológicas que registran variaciones en la concentración de calcio intracelular en
392 respuesta a diversas drogas, permiten proponer que en los genomas de *Trypanosoma brucei* y
393 *Leishmania mexicana* existen secuencias génicas que codifican para canales de calcio. El presente
394 trabajo pretende llegar a la identificación de las secuencias de canales de calcio, en *Trypanosoma*
395 *brucei* y *Leishmania mexicana*, mediante el alineamiento de secuencias entre los canales de calcio
396 descritos en eucariotas superiores y las secuencias de los proyectos genomas de estos parásitos.

397

398

MATERIALES Y MÉTODOS

399

400 **La metodología utilizada para la identificación *in silico* de los canales de calcio presentes en**
401 ***Leishmania mexicana* y *Trypanosoma brucei*:** Para llegar a la determinación de algún tipo de canal
402 de calcio se usaron secuencias de diferentes tipos de organismos, ya que, se había identificado el
403 tipo de canal de calcio tipo L en estos organismos (Benaim et al, 2013). Sin embargo, viendo que
404 los trypanosomatideos y las plantas poseen acidocalcisomas (son organelos ácidos que acumulan
405 calcio) un organelo inicialmente reportada en plantas se procedió a evaluar la presencia de canales
406 de calcio similares a los presentes en plantas en estos trypanosomatideos.

407

408 Para identificar los tipos de canales de calcio presentes en *L. mexicana* y *T. brucei* primero se utilizó
409 la página de internet llamada NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica/
410 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de aquí se obtuvieron diferentes secuencias de canales de calcio
411 presentes en diferentes tipos de organismos tanto de animales como de plantas.

412

413 Con las secuencias obtenidas del NCBI se realizó un blast en la página llamada GenDB
414 (Bioinformatics and Systems Biology/ <http://www.genedb.org>), , donde encontramos las secuencias
415 génicas de los trypanosomatideos. Se analizó la similitud que tienen las secuencias de los canales de

416 calcio de otras especies con la secuencia de nuestros parásitos de estudio en las páginas del aislado
417 *Trypanosoma brucei* TREU927 y de *Leishmania mexicana*, con lo que se encontró dos secuencias
418 diferentes que tienen su código para cada uno de estos parásitos.

419

420 **Programa de Búsqueda de Dominios**

421

422 La secuencia de esta proteína fue analizada con el programa **Inter Pro Scan** “Integrated search in
423 PROSITE, Pfam, PRINTS and other family, and domain database”
424 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>), con la finalidad de identificar en ellas
425 dominios conservados y motivos específicos. Adicionalmente, las secuencias de esta proteína fueron
426 analizadas con el programa “*Calmodulin Target Database*”
427 (http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/no_flash.htm), con la finalidad de búsqueda de posibles
428 dominios de unión a CaM.

429

430 **Programas de Predicción Topográfica**

431

432 Nuestra secuencia fue analizada con los programas:

433

- 434 • **TopPred** “Topology prediction of membrane proteins”; Deveaud and Schuerer (Institut
435 Pasteur) new implementation of the original toppres program, based on G. von Heijne
436 algorithm) (<https://galaxy.pasteur.fr/forms::toppred>).
- 437 • **HMMTOP** “Prediction of transmembrane helices and topology of proteins (Hungarian
438 Academy of Sciences)” (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>).
- 439 • **TMHMM** “Prediction of transmembrane helices in proteins (CBS; Denmark)”
440 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

441

442 **Programas de Análisis de Estructura Primaria**

443

444 Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa **Compute PI/Mw** “Compute the
445 theoretical isoelectric point (*pI*) and molecular weight (Mw) from a UniProt Knowledgebase entry or
446 for a user sequence”, con el fin de obtener información sobre su composición aminoacídica, tamaño
447 relativo y posible punto isoelectrico.

448

449 **RESULTADOS**

450

451

452

453

454

455

456 Se analizó la similitud que tiene la secuencia de la isoforma X3 del canal de cationes disparado por
457 estrés permeable al calcio de *Ananas comosus* (XP_020098678.1), con secuencia de *Leishmania*
458 *mexicana* y *Trypanosoma brucei*. Se encontró una secuencia para cada uno de estos parásitos; para
459 *Leishmania mexicana* arrojó la secuencia codificada como LmxM.16.1190.1 y para *Trypanosoma*
460 *brucei* arrojó la secuencia codificada como Tb927.8.5240, cada uno con una probabilidad de
461 hallazgo aleatorio de 5×10^{-16} y 8.8×10^{-16} , respectivamente, con estos parámetros podemos decir que
462 hay una baja probabilidad que el hallazgo haya sido aleatorio. En ambas secuencias se encontró el
463 dominio DUF221. Las proteínas DUF221 son una familia de canales de cationes permeable al
464 calcio osmosensible, que está conformada por 1104 aminoácidos, con una masa de 12401 KDa y un

465 punto isoeléctrico de 6.0 pH. En la figura 1, observamos la secuencia obtenida en el programa
466 GenDB presente en *Leishmania mexicana*, la cual constituye un posible nuevo canal de calcio.

467

```
468 >LmxM.16.11901  
MSTPSLPPNAKYDDQGIYLSFIAGGILLAVLGGCMAFLSYTPILWIKRFYRPNHTVEPTPLTRAASATA VAAARRVAQG  
469 GVPNVSPSSPLTEVIFAEHTVRPHGRHGHAVTRRKRLGISLPYLSTFFIRPTWQDWISIEEPSLRDRKCSALSVPVHYETPT  
LPTRQTSDRSFVPLQVPPYPAHRRRNGSRAAQPGSEGYGQDGASPAAGSPDFSPRHRPSLRSYGALLESWDQTSPLGT  
470 SDGATASLQALPKTAVDPLVAVYLFLLKFFSLMFLGELFTVWIMVIAQKDNYMERTLIQRDIHDKSQQDNDTVGCELR  
KPYCYRGGDLGCGVVALHGLYDLTVLNISPRSQRWMMVGVNLNLCFCVVLVFLTLKLVKYGKYAEAVMANQMRHAL  
471 GYRVVVCVRGLDATNVCTDRAFREAFLRLSVYFPHASPSASDSLAATAAATSPSIGAHRRRGGGTGNSPARRDNTNGF  
DVESDSEASYLVCDFPGLNCLFSTAGMHYYVRRSDATFTEPENVEQLITREPPLGTLEIIAETEAMANLQEIAIADKA  
472 LQRRQLRHATRASATMWRGRRSLRGARFPPGRTASVVVSSNDVIFEDVAARHNSHADDRREAVLMMRAPFPSCCD  
KMPAVPYEAVFFRCVRNMNMALERVPPQQVAGAAFFVFKNSLCAHEFMQLFTARFGGLFSSLTATIAGPPGRIFQS  
473 SLTAGRCALWLRVVFIFLLYVLLLTWSIPISILGSLEQLSEISSIAVLRKYSELPKWMRSLINAYLPV GALALLNIALPHIIRFLV  
RAMGAFNRAECDGGQLYMQYVFMVVTAVIFQAAFQGAVSRLADLLAKPDHAIINFFVSCISPSNGFYAKVITATCLS  
474 TWVDDLDPVGIKVLVLLRGRAHIQRNYDALFLPCEFEFPRLLSFDMVLSMGLLFHMTAPLLGLLVVVCYFLVRYWSQRAK  
QCDRYRPTLSPAHDCTDFGVAAQVIRCVMWLYCFSETCGVLLMTLRAHRGGVVMCSLALGTGVGLTIYVYLQTRKWT  
475 ASLANARHFARNAHHFYSQHAVQQATSAPTVTPLRAFPSKRAAEVSGGNAGTNPHATPPSLSANPPAGVAATDASP  
SHLYAGSEDPYESEDDVAEQRGSFNTRNSVVQEEGALDRYENVTLQQVLFDATRNPFLSHLLPRKPLTMRYQPKHQR  
476 LAVINAAAELRAMKNTDFVVERYWDREMTWFEEDAGVYRDLMDDEYVSEYRYGDMADLDSNDGDDSNQGRGD  
ALHPMHTQLMDGHDVSPTQVSAAVPPSVKSGRLTAATVLTDLRVVDPNTRQKTAVVATFMPVAAAAENAQGG  
477 AVNHKLTASTPTVTAHSHGSSGAPDRRYASTLPPPPPLRSYEEQRADESASLLQTRLQCSDPSPHTTLEANDI  
LCVVT EPVMSNDEPP SPTG*
```

478

479 **Figura 1. Secuencia del posible canal de calcio presente en *Leishmania mexicana*.** Secuencia
480 consenso para posible canal de calcio de *L. mexicana* obtenida en el GenDB mediante un blast de la
481 secuencia de isoforma X3 del canal de cationes disparado por estrés permeable al calcio de *Ananas*
482 *comosus* (XP_020098678.1).

483

484 La secuencia encontrada de introdujo en el programa “**Compute PI/Mw**”
485 (https://web.expasy.org/compute_pi/), empleando el servidor **ExpASY Proteomics**, el cual permitió
486 predecir una proteína contentiva de 1434 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 158.13
487 KDa y un punto isoeléctrico de 7.99 (Figura 2).

488

489

490 MSTPSPPLPFPN AKYDDQGIYL SFIAGGILLA VLGGCMAFLS YTPILWIKRF YRPNHIVEPT
70 80 90 100 110 120
491 PLTRAASATA VAAARRVAQG GVPNVSEPPSS ELTEVIPAEH TVRPHGRHGH AVTRRRLGI
130 140 150 160 170 180
492 SLPYLSTFFI RPTWQDWISI EEPSSLRDRKC SALSFPVHYET FTLPTRQTSQ RSFVPLQVPP
190 200 210 220 230 240
493 YPAHRRRRNGS RAAQPGSEGGY GQDGASPAAG SPDFSPRHRF SLRSYGALDE SWDQTSILPGT
250 260 270 280 290 300
494 SDGATASLQA LPKTAUDELV AVYLFILKFF FSLMFLGELF TWWMVIAQR DNYMERTLIQ
310 320 330 340 350 360
495 RDIHDCRQD NDTVGCCELRR FYCYRGRDGL GCGVVVALHGL YDLTVLNISF RSQRMMWVGV
370 380 390 400 410 420
496 LNLFCFCVVLV FLTLLYLKKV GKYAEAVMAN QMRHALGYRV VCVRGLDATN VCTDRAFREA
430 440 450 460 470 480
497 FLRLSVYFFH ASPSPSASDS LAATAATSE SIGAHRRRGG GTGNSPARRD NINGFDVESD
490 500 510 520 530 540
498 SEASYLVQDF PGLNCLFSTA GSHYVVVRRS DATFTEPENV EQILITREF LGTLEIIAET
550 560 570 580 590 600
499 EAPMANLQEA IADEKALQR QRLRHATRAS ATMWRGRRL RGARPPPGRAT ASVVVSSNDV
610 620 630 640 650 660
496 IFEDVAARHN SHADDRREAV LMMRAPFPCS CDMKPAVPYV EAVFFRCVRN MMMALEKRVQ
670 680 690 700 710 720
497 QQVAGAAAFV FRNSLCAHEF MQLFTARFGG LFSSLTATIA GPPGRIFQSS LTAGRCALWL
730 740 750 760 770 780
498 RFVFIFLLYV LLLLTWSIPI SILGSLEQLS EISSIAVLRK YSELPKMMS LINAYLPVGA
790 800 810 820 830 840
499 LALLNIALPH IIRFLVRMG AFNRAECDGG QLYMQYVFMV VTAVIFQAAF QGAUSRLADL
850 860 870 880 890 900
498 LAKPDHDAII NFFVSCISPS NGYFYARVIT ATCLSTWVDL LDFVGIKLV LLRGRAHIQR
910 920 930 940 950 960
499 NYDALFLPCE FEFFRLLSFD LMLVLSMGLLE HMTAPLLGLL VVCYFLVRYW SORAKQCDRY
970 980 990 1000 1010 1020
500 RPTLSPAHDG TDFGVAAQVI RCVMWLYCFS ETCGVLLMTL RAHRGGVVMC SLALGTGVGL
1030 1040 1050 1060 1070 1080
501 TIYVYLQTRR WTASLANARH FARNAHMFYS QHAVQQATSA FTVTTPFLRAF PSKRAAEVSG
1090 1100 1110 1120 1130 1140
502 GNAGTNPBAT PPSLSANPPA GVAATDASP S HLYAGSEDPY ESEDDVAEQR GSPNTRNSVW
1150 1160 1170 1180 1190 1200
501 QEEGALDRYE NVTLQVFLFD ATRNPELSHL LPRKPGLTMR YQPKHQRLAV INAAAEILRAM
1210 1220 1230 1240 1250 1260
502 KNTDFVVERV WDREMTWFE DAGVYRDLDM DDEYVSEYRY GDMADLDSND GDDSNQGRGD
1270 1280 1290 1300 1310 1320
502 ALHEMHTQIM DGHDVSPQV SAAVPPSVKS GLRTAATVLT TDLRVVVDN TRQQTAVVA
1330 1340 1350 1360 1370 1380
503 TFMFVAAAAE NAQGGAVNHK LTYASTPTVV TAAHSHEGSS GAPDRRYAST LPPPPPLRSY
1390 1400 1410 1420 1430 1440
503 EEQRADDESA QSLQLTRLQC SDPSPPHITL EANDILCVVT EPVMSNDEPF SFTG

504

505 **Figura 2.- Secuencia aminoacídica del posible canal de calcio en *Leishmania mexicana*. Los**
506 **cálculos se realizaron con ayuda del programa Compute PI/Mw.**

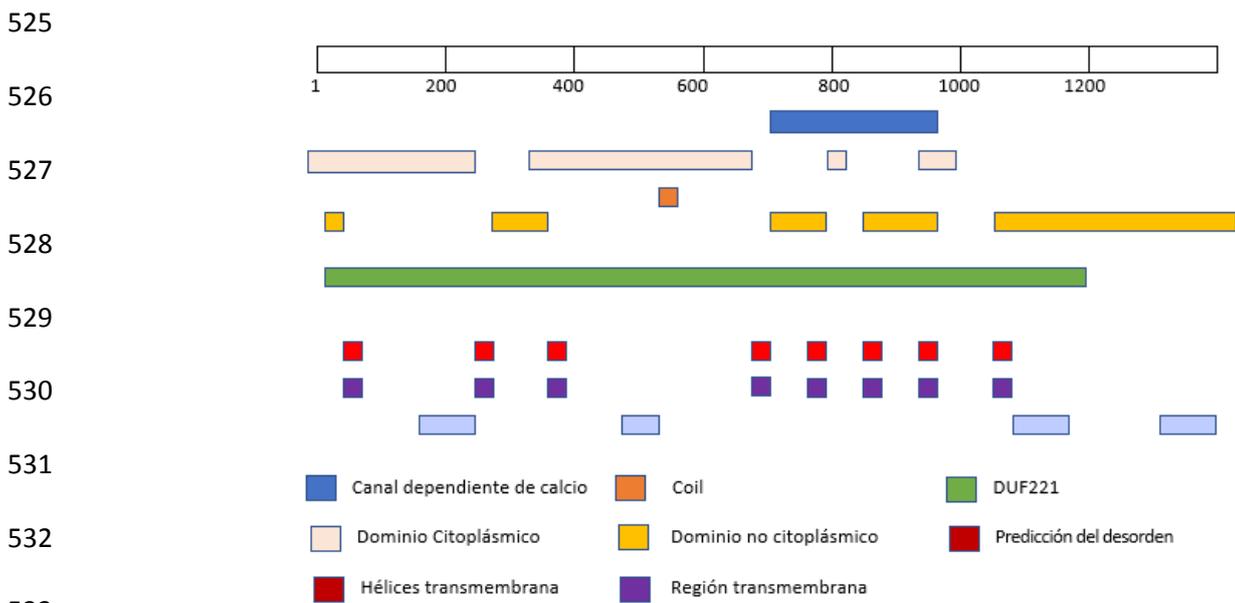
507

508 **Caracterización de los dominios funcionales presentes en este canal de calcio presente en *L.***
509 ***mexicana*.**

510

511 Con el propósito de evaluar la presencia de los dominios funcionales característicos de este posible
512 canal de calcio procedimos a realizar su análisis con el programa InterProScan. Los resultados se
513 muestran en la figura 3, donde cabe destacar que en el dominio de color azul que va del aminoácido
514 720 al 953 tenemos localizado un canal dependiente de calcio.

515 Posee 4 dominios citoplasmáticos visualizados con el color rosa entre los aminoácidos (43-259),
 516 (377-716), (796-814) y (947-1004), conforma un coil en el domino representado por el color naranja
 517 en el aminoácido 536 al 556, posee 4 dominios no citoplasmáticos representados en color amarillo
 518 en los aminoácidos (1-19), (288-353), (738-772), (834-919) y (1026-1433), tenemos localizada la
 519 proteína DUFF221 en un dominio representado con el color verde oscuro en los aminoácidos 4 al
 520 1185. Localizamos las posibles hélices transmembrana que se encuentran presentes en 8 dominios
 521 de color rojo y son los aminoácidos (20-42), (264-286), (354-376), (717-739), (773-795), (815-
 522 837), (927-949) y (1004-1026), se tiene una región transmembrana en 8 dominios representados con
 523 el color morado en los aminoácidos (20-42), (269-288), (355-377), (718-740), (774-796), (816-838),
 524 (928-950) y (1005-1025).



535 **Figura 3.- Dominios funcionales presentes en el presunto canal de calcio localizado en**
 536 ***Leishmania mexicana*.** El esquema muestra los principales dominios funcionales encontrados en la
 537 secuencia de la proteína LmxM.16.11901 de *L. mexicana*. Este esquema fue arrojado por
 538 InterproScan.

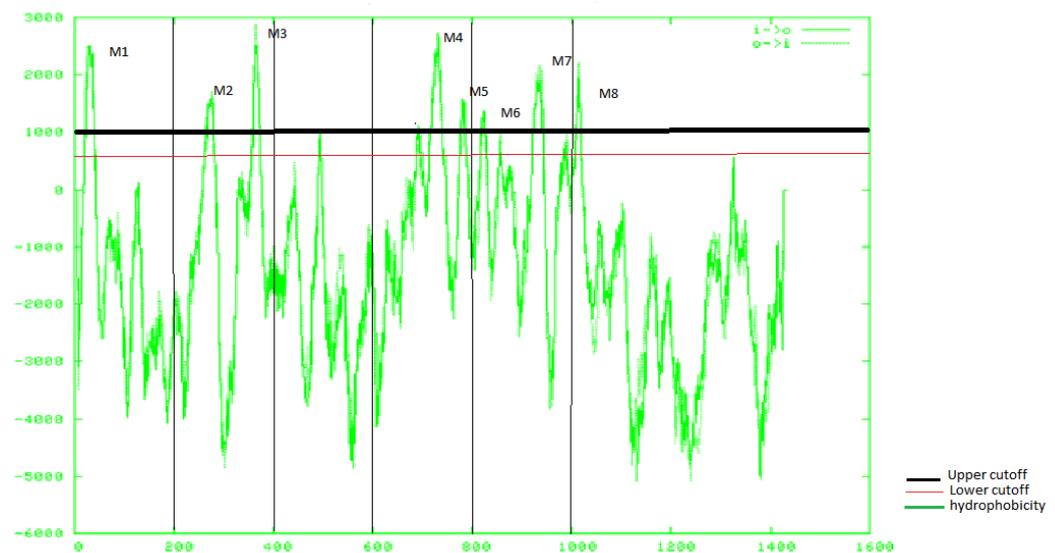
539

540 **Identificación de posibles dominios transmembrana presentes en este presunto canal de calcio**
541 **en *L.mexicana*.**

542

543 Para una búsqueda más detallada de regiones altamente hidrofóbicas se realizó un análisis con
544 ayuda de los programas **Tmpred** (membrane-spanning region prediction). La figura 4 muestra la
545 escala de hidrofobicidad para nuestra secuencia obtenida por el programa **Tmpred**, este análisis nos
546 permitió seleccionar 8 posibles dominios transmembrana (TM), con una alta confiabilidad cercano 0
547 mayor a 1000. Para verificar la posición de los dominios TM seleccionados, se empleó el programa
548 HMMTOP (2.0 Prediction of transmembrane hélices and topology of protein), el cual corroboró
549 nuestra selección. La posición de los dominios TM sobre la secuencia obtenida para esta proteína,
550 arrojados por cada programa se muestra en la tabla 1.

551



559

560 **Figura 4. Posibles dominios transmembrana presentes en este posible canal de calcio de *L.***
561 ***mexicana*.** El esquema muestra los principales dominios transmembrana encontrados en la
562 secuencia del posible canal de calcio de *L. mexicana*. Este esquema fue arrojado por el programa
563 **Tmpred**. Valores superiores a 1000 (línea negra) sugieren dominios transmembrana altamente
564 confiables. Valores entre 600 y 1000 (línea roja) sugieren posibles dominios transmembrana.

565 **Tabla 1. Posibles dominios transmembrana del posible canal de calcio presentes en *L.***
 566 ***mexicana.***

Domios Transmembrana del posible canal de calcio	POSIBLES DOMINIOS TRASMEMBRANA (InterProScan)	POSIBLES DOMINIOS TRASMEMBRANA (Tmpred)	POSIBLES DOMINIOS TRASMEMBRANA (HMMTOP)
M1	20-42	18-42	17-41
M2	269-288	269-287	259-284
M3			324-345
M4	354-376	355-376	354-376
M5			436-454
M6			484-506
M7			661-677
M8		682-700	681-703
M9	718-740	721-745	716-736
M10	774-796	770-794	770-791
M11	818-838	815-834	811-831
M12		847-871	847-865
M13	928-950	920-944	862-891
M14		969-986	927-946
M15	1005-1025	1007-1025	1004-1025
M16			1312-1336

567 *Secuencias predichas con un bajo nivel de confiabilidad del programa utilizado

568

569 **Análisis de la presencia de dominios de unión a Calmodulina (CaM) en el posible canal de**
 570 **calcio de *L. mexicana.***

571

572 Para poder evidenciar si se trata de un posible canal de calcio procedimos a buscar dominios de
 573 unión a CaM, utilizamos el programa “*Calmodulin target Database*”, el cual permite definir
 574 posibles dominios no convencionales de unión a CaM. Este programa utiliza como criterios: la
 575 hidrofobicidad de la secuencia, su tendencia a generar estructuras α -hélices, la carga de los residuos
 576 aminoacídicos presentes y el tamaño de los mismos para predecir dominios de unión a CaM. Los
 577 resultados del análisis se muestran en la figura 5, con un puntaje de 0 a 9, donde 9 indica la mayor
 578 probabilidad de que esa región o dominio sea capaz de enlazar CaM. En esta figura podemos
 579 observar una posible región de unión a CaM con los mayores puntajes, ubicada entre los
 580 aminoácidos 889 y 898, el cual tiene una alta probabilidad de interactuar con la CaM.

581

```

582      ..851 FVSCISPSN GYFYAKVITA TCLSTWVDLL DPVGILKVLV LRGRAHIQRN
      ..... 0000000000 0000000000 0000000011 2345678999 9999999987
583      ..901 YDALFLPCEF EFPRLLSFDL MVLSMGLLFH MTAPLLGLLV VCYFLVRYWS
      ..... 6543211000 0000000000 0000000000 0000112222 2223333333
584      ..951 QRAKQCDRYR PTLSPAHDCT DFGVAAQVIR CVMWLYCFSE TCGVLLMTRLR
      ..... 3333211111 1110000000 0000000000 0000000000 0000000000
585      .1001 AHRGGVVMCS LALGTGVGLT IYVYLQTRKW TASLANARHF ARNAHFYSQ
      ..... 0000000000 0000000011 2345666666 6666666654 3211000000
586      .1051 HAVQQATSAP TVTTPLRAFP SKRAAEVSGG NAGTNPHATP PLSANPPAG
      ..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
587      .1101 VAATDASPSH LYAGSEDPYE SEDDVAEQRG SPNTRNSVVQ EEGALDRYEN
      ..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
588
589
590

```

591

591 **Figura 5. Dominio de unión a calmodulina presente en el posible canal de calcio de *L.***
 592 ***mexicana*.** La figura muestra el análisis de nuestra secuencia del posible canal de calcio en *L.*
 593 *mexicana* programa “*Calmodulin target Database*”. El programa evalúa la secuencia asignando
 594 valores entre 0 y 9, donde 9 representa un posible dominio de unión a CaM.

595

596 En el caso de *Trypanosoma brucei*, se encontró la secuencia codificada como Tb927.8.5240, en la
597 figura 6, observamos la secuencia encontrada en la base de datos GenDB

598 **>Tb927.8.5240**
599 MDPHPTPLNPDATWDDNGLLFTLLMGVFAFIGLGAVSAFTVYAPSMWLRVFRNLNHTAVVLEVEEPLGGDVETLQAP
600 DDKEPRYRRVGCALPYPCSLFVLPWSKCVLSVEEAVEGLENVFKPLVDSESGNPAGIGDNADDRGSVAGDDDETAPLT
601 RDHISSEYPATVEVDIEGVSSGSPVGNVPSRTNSAPKTPLDPHVAVYLYFLKLFSTVFILGSCINLWICVLAGTDDYREKSM
602 VSMDEKHCGAQGSNRTGCMELMPYCHYTDADTCVPVPLHGIYDLTMRNITPNSWRLWFVALLDMAFCLFFIAAIVYY
603 LRKVDKYVETVMRHQMECAVGHRAIVGGLKGRVLTEAAFRRRYLQEDSYFGPNRRGVNTFRYPVAVANALMGGTL
604 SVDDGDTYHQYDCGGLSCIFSSCFTRYKTTRSNAVFLQDGSVRRMLFPRDPPPGMYTYMDKTEEAMEGLQEAVADY
605 KVFHKLANHVSYKKRQELHKKLLVRSFPCFSMISKVDYWKAFIERATKLNRFVDEVPARKPKGIAYVVDNPLAAY
606 EFVNLFYAQHRGASGTWAAIAGPPNGIEMNITTNRQVGWVRRIVVAVIYILMLLFWVSPVGFLLSIDNISKIPGMGWL
607 SRDSSKLPENVRSAIAALLPVGVLAFLNIALPYIVRILAIAMGVINMYEREALHLQYLFMVLTVGIFQAPLQNGMEELN
608 RLITEISRDSIAKLFVTFVTPEGGYWYTKVVMGLCVSTWVAFLNPGTLTLVVLQHKLANVQRVYNELFGPCLFEWPHLYS
609 FDLSELLAMGLLFHMTVPLLSFFVGIYFVVRYFTQRMGLYDRYPENHPRQDCTPFGAAGMVIRAAACWLYCLGAVGGVL
610 FMNELDHLGGLLICSVSFTLSVILLAYTHITRRWIATLPNARRLLRNRVPRSVQTQYGTSSRSADNVVAPKLPNPKPPARA
611 EEERREADSAVTFQGATLPVVPKQYSMETLDAFDGVAGPTHCAPTTSLWQSRGMQSSPVGSVCNLQDPDGTSEM
612 EGVVEWDAAPDAEDDMLYHRMSLLPHNPNVDSRYNPRHQQLQRINITHEIERLEETIFHVERYWDAPYSEVNPEECGI
613 IEQR

606 **Figura 6. Secuencia del posible canal de calcio presente en *Trypanosoma brucei*.**

607 Secuencia consenso para posible canal de calcio de *T. brucei* obtenida en el GenDB mediante
608 el alineamiento con la secuencia de isoforma X3 del canal de cationes disparado por estrés
609 permeable al calcio de *Ananas comosus* (XP_020098678.1).

610
611 La secuencia encontrada se introdujo en el programa “**Compute PI/Mw**”, empleando el
612 servidor **ExPASy Proteomics**, el cual permitió predecir una proteína contentiva de 1104
613 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de 124.16 KDa y un punto isoeléctrico de
614 6.07 (Figura 6).

615

616

617

618

619

620

621 MDPHPPTPLNP DATWDDNGLL FTLLMGVFAF IGLGAVSAFT VYAPSMWLRRL VFRLNHTAVV

622 LVEEEPLGGD VETLQAPDDK EPRYRRVGCA LPYPCSLFVL PSWKCWLSVE EAVEGLENVF

623 KPLVDSSEGN PAGIGDNADD RGSVAVGDDDE TAPLTRDHIS SEYPATVEVD IEGVSSGSPV

624 GNVPSRTNSA PKTPLDPHVA VYLYFLKLFV TVFILGSCIN LWICVLAGTD DYREKSMVSM

625 DEKHCQAQGS NRTGCMELMP YCHYTDADTC VVPLHGIYD LTMRNITPNS WRLWFVALLD

626 MAFCLFFIAA IVYYLRKVDK YVETVMRHQM ECAVGHRAI VVGLKGRVLT EAAFRRRYLQ

627 EDSYFGPNRR GVNTFRYPVA VANALMGGLT SVDDGDTYHQ YDCGGLSCIF SSCFFTRYKT

628 TRSNAVFLQD GSVRRMLFPR DPPPGMYTYM DKTEEAMEGL QEAVADYKVF HKLANHVSYK

629 KRQELHKKLL LVRASFPFCF SMISKVDYWK KAFIERATKL NRFVDEVPAR KPKGIAVYVF

630 DNPLAAYEFV NLFYAQHRGA SGTWAAIAGP PNGIEMNIT TNRQVGVVRR IVVAVIYILM

631 LLLFWSVPVGF LSSIDNISKI PGMGWSRDS SKLPENVRSA IAALLPVGVL ALFNIALPYI

632 VRILAIAMGV INMYERECA LHLQYLFMVL TGVIFQAPLQ NGMEELNRLI TEISRDSIAK

633 LFTVFTVPEG GYWYTKVVMG LCVSTWVAFV NPGTLTLVVL QHKLAVQRV YNELFGPCLF

634 EWPFLYSFDL SLLAMGLLFH MTVPLLSFFV GIYFVVRYFT QRGMLYDRYR PENHPRQDCT

635 PFGAAGMVIS AACWLYCLGA VGGVLFMNEL DHLGGLLICS VSFTLSVILL AYTHITTRRW

636 IATLPNARRL LRNRVPRSVQ TQYGTSSRSAD NVVAPKLPNP KPPARAEER READSAVTFQ

637 GATLPVPRK QYSMETLDA FDGVAGPTHV APTTSLWQS RGMQSSPVGS VCNLQDPDGT

638 EMEGVVEWDA APDAEDMLY HRMSLLPHNP NVDSRYNPRH QQLQRINITH EIERLEETIF

639 HVERYWDAPY SEVNPEECGI IEQR

638 **Figura 7.- Secuencia aminoacídica del posible canal de calcio en *Trypanosoma brucei*. La**
639 **traducción de realizo con ayuda del programa Compute PI/Mw.**

640

641 **Caracterización de los dominios funcionales presentes en este canal de calcio presente en *T.***
642 ***brucei*.**

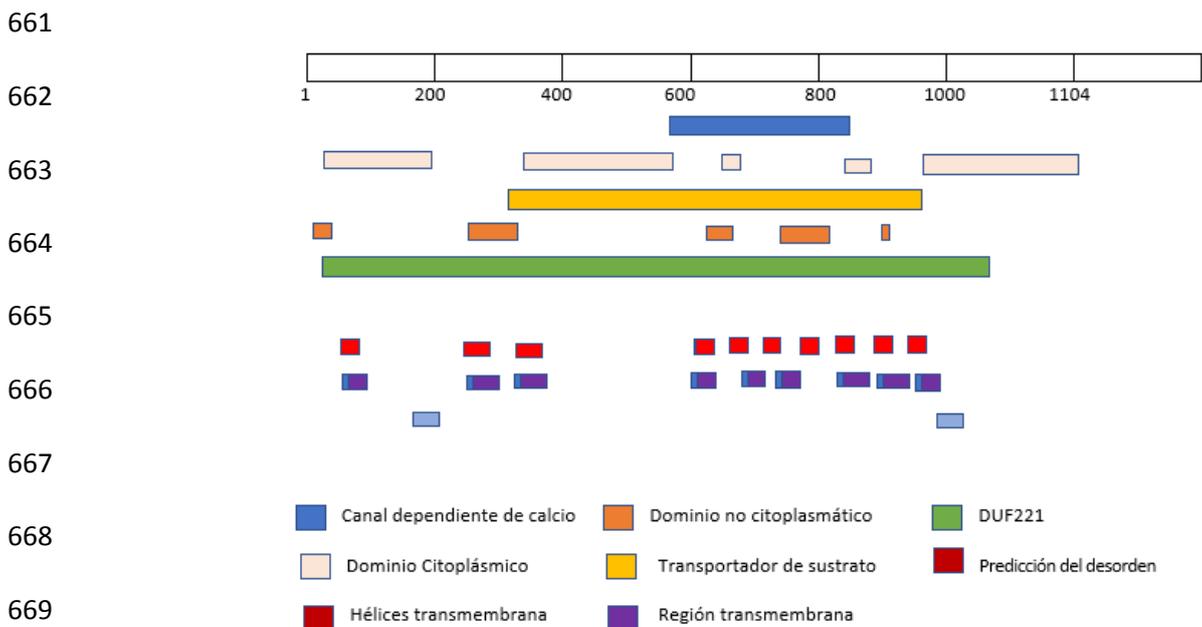
643

644 Con el propósito de evaluar la presencia de los dominios funcionales característicos de este posible
645 canal de calcio procedimos a realizar su análisis con el programa InterProScan. Los resultados se

646 muestran en la figura 8 donde cabe destacar que en el dominio de color azul que va del aminoácido
 647 589 al 836 tenemos localizado un canal dependiente de calcio, posee 5 dominios Citoplasmático
 648 visualizados con el color rosa entre los aminoácidos (44-200), (316-586), (668-678), (821-840) y
 649 (893-1104).

650

651 Conforman un transportador de sustrato en el dominio representado por el color amarillo del
 652 aminoácido 281 al 922, posee tiene 5 dominios no citoplasmático representados en color naranja en
 653 los aminoácidos (1-19), (229-292), (607-639), (700-791) y (868-872), tenemos localizada la
 654 proteína DUFF221 en un dominio representado con el color verde oscuro en los aminoácidos 5 al
 655 1061 y otro tipo de proteína en los mismos aminoácidos representado en un dominio de color verde
 656 claro. Localizamos las posibles hélices transmembrana que se encuentran presentes en 10 dominios
 657 de color rojo y son los aminoácidos (20-42), (201-223), (293-315), (592-614), (639-661), (681-
 658 699), (737-759), (797-819), (844-866) y (873-895); se tiene una región transmembrana en 9
 659 dominios representados con el color morado en los aminoácidos (20-43), (201-228), (293-315),
 660 (587-606), (640-667), (679-699), (792-820), (841-867) y (873-892).



671 **Figura 8.- Dominios funcionales presentes en el presunto canal de calcio localizado en *T.***
672 ***brucei*.** El esquema muestra los principales dominios funcionales encontrados en la secuencia de la
673 proteína Tb927.8.5240 de *T. brucei*. Este esquema fue arrojado por InterproScan.

674

675 **Identificación de posibles dominios transmembrana presentes en este presunto canal de calcio**
676 **en *T. brucei*.**

677

678 Para una búsqueda más detallada de regiones altamente hidrofóbicas se realizó con ayuda de los
679 programas Tmpred (membrane-spanning region prediction). La figura 8 muestra la escala de
680 hidrofobicidad para nuestra secuencia obtenida por el programa Tmpred, este análisis nos permitió
681 seleccionar 10 posibles dominios transmembrana (TM), con una alta confiabilidad cercano 0 mayor
682 a 1000. Para verificar la posición de los dominios TM seleccionados, se empleó el programa
683 HMMTOP (2.0 Prediction of transmembrane hélices and topology of protein), el cual corroboró
684 nuestra selección. La posición de los dominios TM sobre la secuencia obtenida para esta proteína,
685 arrojados por cada programa se muestra en la tabla 2.

686

687

688

689

690

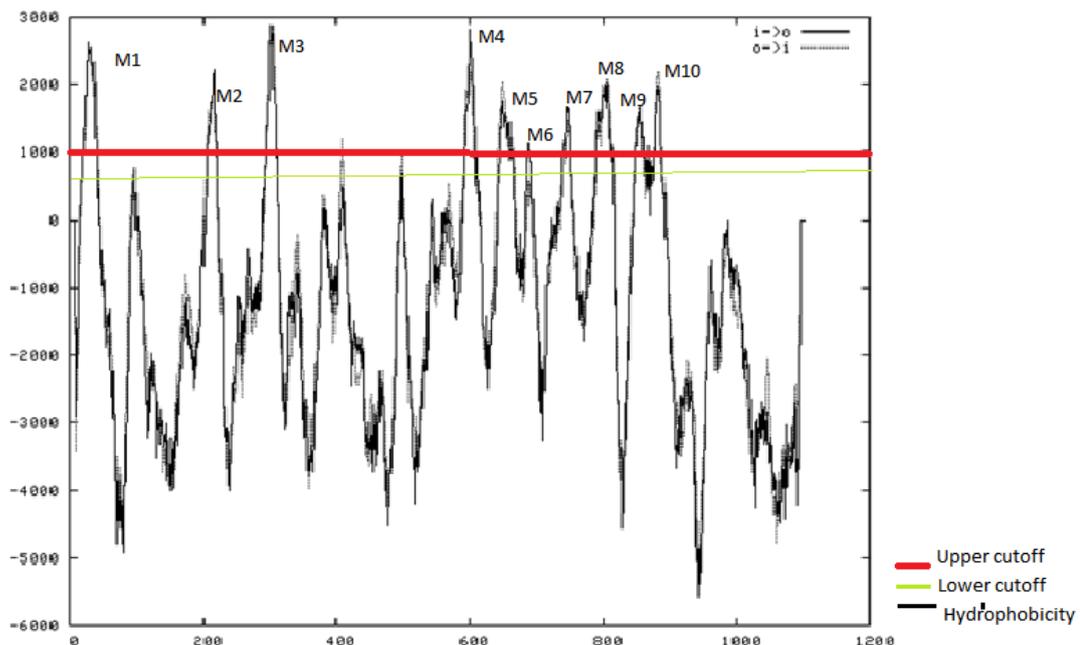
691

692

693

694

695



696 **Figura 9. Posibles dominios transmembrana presentes en este posible canal de calcio de *T.***
697 ***brucei*.** El esquema muestra los principales dominios transmembrana encontrados en la secuencia
698 del posible canal de calcio de *T. brucei*. Este esquema fue arrojado por el programa Tmpred. Valor
699 superiores a 1000 (línea roja) sugieren dominios transmembrana altamente confiables. Valores entre
700 600 y 1000 (línea verde) sugieren posibles dominios transmembrana.

701

702 **Tabla 2. Posibles dominios transmembrana del posible canal de calcio presentes en *T. brucei*.**

Domios Transmembrana del posible canal de calcio	POSIBLES DOMINIOS TRASMENBRANA (InterProScan)	POSIBLES DOMINIOS TRASMENBRANA (Tmpred)	POSIBLES DOMINIOS TRASMENBRANA (HMMTOP)
M1	20-42	18-42	19-43
M2		87-103	
M3	201-223	208-226	208-227
M4	293-315	293-315	293-315
M5		371-392	371-390
M6		400-418	
M7		489-509	488-504
M8		559-579	535-554
M9	592-614	591-614	591-614
M10	639-661	640-661	645-669
M11	691-699	685-701	680-699
M12	737-759	734-760	730-749
M13	797-819	797-816	790-814
M14	844-866	846-867	845-867
M15	873-895	875-895	876-895

703 *Secuencias predichas con un bajo nivel de confiabilidad del programa utilizado

704 **Análisis de la presencia de dominios de unión a CaM en el posible canal de calcio presentes en**

705 **T. brucei.**

706

707 Para poder evidenciar si se trata de un posible canal de calcio procedimos a buscar dominios de
708 unión a CaM, utilizamos el programa “*Calmodulin target Database*”, el cual permite definir
709 posibles dominios no convencionales de unión a CaM. Este programa utiliza como criterios: la
710 hidrofobicidad de la secuencia, su tendencia a generar estructuras α -hélices, la carga de los residuos
711 aminoacídicos presentes y el tamaño de los mismos para predecir dominios de unión a CaM. Los
712 resultados del análisis se muestran en la figura 5, donde un puntaje de 0 a 9, donde 9 indica la mayor
713 posibilidad de que esa región o dominio sea capaz de enlazar CaM. En esta figura podemos

```
..351 EAAFRRRYLQ EDSYFGPNRR GVNTFRYPVA VANALMGGTL SVDDGDTYHQ  
..... 5555554321 1000000000 0000000000 0000000000 0000000000  
  
..401 YDCGGLSCIF SSCFFTRYKT TRSNAVFLQD GSVRRMLFPR DPPPGMYTYM  
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000  
  
..451 DKTEEAMEGL QEAVADYKVF HKLANHVSYK KRQELHKKLL LVRASFPFCF  
..... 0000000000 0000000000 0112345678 9999999999 9876543211  
  
..501 SMISKVDYWK KAFIERATKL NRFVDEVPAR KPKGIAVVVF DNPLAAYEFV  
..... 1234555555 5555555554 3211000000 0000000000 0000000000  
  
..551 NLFYAQHRGA SGTWAAIAGP PNGIEMNIT TNRQVGWVRR IVVAVIYILM  
..... 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000 0000000000
```

714 observar una posible región de unión a CaM con los mayores puntajes. Ubicada entre los
715 aminoácidos 482 y 492. El cual tiene una alta probabilidad de interactuar con la CaM.

716 **Figura 10. Dominio de unión a calmodulina presente en el posible canal de calcio de T. brucei.**

717 La figura muestra el análisis de nuestra secuencia del posible canal de calcio en T. brucei programa
718 “*Calmodulin target Database*”. El programa evalúa la secuencia asignando valores entre 0 y 9,
719 donde 9 representa un posible dominio de unión a CaM.

720

721 En la figura 11, se muestra el alineamiento de las secuencias seleccionadas *Leishmania mexicana*,
722 *Trypanosoma brucei* y DUF221 para analizar la homología que existe entre estas, así como
723 también para analizar los dominios transmembrana que se encuentran representados en color
724 amarillo. Mientras que los aminoácidos se encuentran resaltados de color verde representa a la
725 proteína DUF221 presente en *L. mexicana* y *T. brucei*, las letras rojas representan el canal
726 dependiente de calcio, las letras en azul representan el canal de calcio con dominio N-terminal
727 transmembrana que solo se encontró presente en la proteína DUF221 y encontramos los dominios
728 de Calmodulina resaltado de color celeste.

```

729 Leishmania      MST--PSPLPPNARYDDQGIYLSFIAGGILLAVLGGCMAFLS YTPILWIKRFYRPNHT---
Trypanosoma     MDPHPTPLNPDATWDDNGLLFTLLMGVFAFIGLGAVSAFTVYAPSMLRRVFRNLNHTAVV
DUF221          -----
730
731 Leishmania      -VEPTPLTRAASATAVAARRVAQGGVPNVSPSSPLTEVIFAHTVRPHGRHGHAVTRR
Trypanosoma     LVEEEL-----GGDVEILOAPDD-----KEPRY
DUF221          -----MAFQDVGLR--GLH-HLVQRD
732
733 Leishmania      KRLGISLPYLSTFFIRPTWQDWISIEEPSLRDRKCSALSPEVHYETPLPTRQTSDRSFVE
Trypanosoma     RRVGCALPYPCSLFVLPSWKCLSVVEAV-----EGLENVFKE
DUF221          SDNPADTPPTASALVTTLVLPALVSAGAMVLI-----FLILRRSQRRMYMP
734
735 Leishmania      LQVPYPAPRRRRNGSRAAOPGSEGYGDGASPAAGSPD-FSPRHRPRLRS-YGALEESWD
Trypanosoma     LV-----DSESGNPAGIGDNADDRGSAVGDDDETAPLTRDHISSEYPATVE---
DUF221          RT-----YLGVLKPV-
736
737 Leishmania      QTSLPGTSDGA----TASLQALPKTAV--DPLVAVYLF--TLKFFFSLMFLGELFTVWI
Trypanosoma     -VDIEGVSSGSPVGNVPSRTNSAPKTP--DPHVA VYLY--FLKLFSTVFILGSCINLWI
DUF221          -ERTPPVSTTP-WGW-VIDMYKLPDEYVLQHHSMDAYLLIRE LKLVSMICFVGACMTFPI
738
739 Leishmania      MVIAQKDNYMERTLIQRDIHDCRSQDNDTVGCELRKPYCYRGGDGLGCGVVALHGLYDLT
Trypanosoma     CVLAGTDDYREKSMVSMDEKHCGAQGSNRTGCMELMPYCHYT-DADTCVPVPLHGIYDLT
DUF221          LFPINATGGGDNIQLNI-----LS
740
741 Leishmania      VLNISPRSRQWMMVGVNLNLCFCVVLVFLTLLYLKKVGKYAEAVMANQMRHALGYRVVQVR
Trypanosoma     MRNITPNSWR LWFVALLDMAFCLFFIAAIVYYL RKVDKYVETVMRQMECAVGHRAIVG
DUF221          MSNVEESKYERYFAHAF---IANLFIGFVMTVTR-----ESIFYINLRHAYALSPAYAS
742
743 Leishmania      GLDATNVCTDRAFREAFRLRSVYFPHASPSASDSLAATAAATSPSIGAHRRRGGGTGN
Trypanosoma     GLKG-RVLTEAAFRRLYQEDSYF---GPNRRGVNTFRYPVAVANALMGG-----
DUF221          RLSS-RTVLF TAVTEDYLNDRK-----IRKMFGT-----

```

743

744

745

	Leishmania Trypanosoma DUF221	FRCVRRMMALERVFPQQQVAGAAFFVFKNSLCAHEFMQLFT----ARFGGLFSSLTATI IERATKLNRFVDEVPAKPKGIAYVVDNPLAAYEFVNLFY----AQHRGASGTWAA-I ---IERLNPEIEELQAKHRAG-----DAKLVSSVFEFYHQADAQSAYSVAHNLP-LH
746	Leishmania Trypanosoma DUF221	AGP-----PGRIFQSSLTAGRCALWLRVVFIFLLYVLLLLLWSIPISTLGSLEQLSEIS AGP-----PNGIEMNITNTRQVGWVRRVAVVIYIIMLLFWSVPVGLSSIENISKIP MAPRYIGLEPTQVIWSNLRIRWVERVIRYFVTIGFVVALIVFWAIPAVVGSISNITFLT
747	Leishmania Trypanosoma DUF221	S-IAVL-RRYSELFRMRSLINAYLPVGGALALLNIALPHIIRFLVIRAMGAFNRACDGGG G-MGWLSDSSKLPENVEISAIAALLPVGVLFALFNIALPYIVRILAIAMGVINMYERECA EKVPFL-RFINDVPSWIRGVITGLLPTILQSVLMALLPIILRLMAKLGGAPTAAAVELTT
748	Leishmania Trypanosoma DUF221	LVMQYVFMVVTAVIFQAAFOGAVSRLADLLAKFCHDAIINFKYSCIISPSNGYFYAKVITA LHLQYLFVVTIGVIFQAPLQNGHEELNRLITEISRDSIAKLFVTFVTFEGGYWYTKVVMQ QNFYFTFQVIQIFLVVTVASSASSVVSIDIINNPT--SAASLLAKKIPQASNFYISYIILQ
749	Leishmania Trypanosoma DUF221	TCLSTVYDLEDDPVGIL--FVLLLRGR-AHIQRNYDALFLPCEPEFPRLLSFDLNVLSMEL LCVSTVVAFLNP-GTL--TLVVLRKLANVQVVMKELFGPCLFENPHLYSFDLSLLAMSL GLSFSAGALLQISGLIIGKVLGMLFD-NTPRKMFTRWSLSLGLGWGTVYPAFTFLVVVAI
750	Leishmania Trypanosoma DUF221	LFHMTAPLLGLLVVVCYFLVRYWQRAKQCDRYRPTLSPAHDCDFGVAAQVIRCVMWLY- LFHMTVPLLSFFVGIYFVVRYFTQSGMLYRRYRENNHERQDCTPFGAAGMVIRAACWLY- TYSCIAPLVLGFATIGLYLFYFAYRYNML--YVSNADIDTQ GKAYTRALQHITVGCYLLN
751	Leishmania Trypanosoma DUF221	-CFSEICGVLLMTRAHNGGVVMCSLALGTGVLTIYVYLQTRKWTASLANARHFARN-- -CLGAVGGVLFMNELDHLGGLLICSVSFTLSVILLAYTHITRRRWIATLPNARRLLRNRV VCLIGLFAIATGARRIALGPLILMIISL---IVMVIY-HVSLNQALDPLIN-----
752	Leishmania Trypanosoma DUF221	---AHHFYSQHAVQOATSAPTVTIPLRAFPSKRAAEVSGGNAGTNPHATPPSLSANPPAG FRSVQTYGTSRSADNVVAPKLPNPKP--PARAEERREADSAVTFQGGATLPVVPRKQYS -----YIPKNLESEEEALLIQEKGELAPSGGEHSDDAGASGPGKEGI-----DNG
753	Leishmania Trypanosoma DUF221	VAATDASPSHLYAGSEDPYESEDDVAEQRGSNTRNSVVQEEGALDRYENVTLQOVL-FD METDLA---FDGVAGPTHCAPTISLLWQSRGMQSSPVGSVCNLQDPDGTMEGVVEWD VTNVDSA---EKGLTGP---APEPKANFLTKWLRDPKYDSYTRLRRAFNPSSAITT-YT
754	Leishmania Trypanosoma DUF221	AT---RNPFLSH---LLPRKPGLTMRYPKHK---RLAVINAAAELRAMKNTDFVVER-- AAPDAEDDMLYHRMSLLPHNPNVDSRYNPRHQ---QLQRINITHEIERLEETIFHVER-- PEVE-RDAYFHP---SITSQPPL--LWIPRDEIGVSKQEKHTSRVIAITDEDAWLDEKN
755	Leishmania Trypanosoma DUF221	--YWDREMTWFE-EDAGVYRDLDMDDEYVSEYRYGDMADLDSNDGDDSNQGRGDALHPMH --YWDAPYSEVNPEECGIIIEQR----- KIHWL-----MDKGV-----PPIYEEKIYY-----
756	Leishmania Trypanosoma DUF221	TQLMDGHDVSPQTQVSAAVPPSVKSGLRATAATVLTITDLSRVVPDNTROQKTAVVATFMPVA ----- -----
757	Leishmania Trypanosoma DUF221	AAAENAQGGAVNHKLTASTPTVVTAAHSHEGSSGAPDRRYASTLPPPPPLRSYEEQRAD ----- -----
758	Leishmania Trypanosoma DUF221	DESAQSLQTRIQCSDPSPHPTTLEANDILCVVTEPVMSNDEPPSPTG ----- -----

767 **Figura 11.- Alineamiento del posible canal de calcio con los parásitos de estudio *L. mexicana***
768 ***T. brucei*.** Alineamiento realizado con el programa ClustalW2 de EBI. En la secuencia se resaltan
769 dominios transmembrana reportados para *L. mexicana*, *T. brucei* y DUF221 así como los predichos
770 por TopPred los cuales se indican resaltados en color amarillo, se encuentran resaltados los

771 dominios de la proteína DUF221 presentes en *L. mexicana* y *T. brucei* con color verde identificados
772 por el InterProScan, tenemos dominios de los canales dependientes de calcio en *L. mexicana*, *T.*
773 *brucei* y DUF221 representados por las letras en color rojo, se identificó los de Calmodulina
774 presentes en *L. mexicana*, *T. brucei* y DUF221 se encuentran resaltados de color celeste y por
775 último ubicamos el canal de calcio amino terminal transmembrana en la proteína DUF221 el mismo
776 que se encuentra con las letras de color celeste.

777

778

DISCUSION

779

780 Se logró evidenciar la presencia de un posible canal de calcio en *Leishmania mexicana* y
781 *Trypanosoma brucei* homólogo a la secuencia de la isoforma X3 del canal de cationes disparado
782 por estrés, permeable al calcio de *Ananas comosus* (XP_020098678.1), la cual corresponde a la
783 proteína DUF221. Este presenta una secuencia de 895 residuos aminoacídicos prediciendo un PM
784 aparente de 100.16 KDa y contentiva de 11 posibles dominios TM. El programa utilizado para la
785 visualización de dominios de Calmodulina como es el programa “Calmodulin target Database”, el
786 cual nos sugirió la presencia de un domino de alta confianza de unión a CaM,. El cula nos da un
787 indicio de que sea un canal de calcio

788

789 Los genes que contienen el dominio DUF221 desempeñan papeles importantes en la biología del
790 desarrollo, la transducción de señalización hormonal y las respuestas al estrés abiótico. Se
791 desconoce la función del domino 221 que se encuentra en el carbono terminal mientras que en el
792 amino terminal se encuentran los dominios de tres hélices transmembrana predichas con los
793 diferentes programas *in silico* utilizados (Sokabe, 2010). Se desconoce la función del dominio
794 dado que probablemente se trate de un dominio localizado en el cerebelo en las regiones
795 neuroterminales.

796

797 En el carbono terminal de este dominio 221, se encuentran 6 posibles hélices transmembrana
798 mientas que en el amino terminal tenemos 2 hélices transmembrana esto nos sugiere una cantidad
799 de 8 hélices transmembrana, los dos grupos de hélices transmembrana parecen estar vinculadas por
800 un total de 200 aminoácidos (Hou, et al, 2014). Al ser una proteína localizada en neuronas es muy
801 probable que tenga diferentes mecanismos de acción ya que se encuentra en la región no citosólica
802 donde puede interactuar con otros metabolismos

803

804 Esta proteína es codificada por el gen AtCSC1 expresada por *Arabidopsis* este tipo de proteínas
805 responden a canales de calcio tipo (TPR) (Sokabe, 2010). Por lo que no se han desarrollado
806 drogas para inhibir estos canales dado que es muy peligrosa su inhibición.

807

808 En las membranas de la célula, particularmente la entrada de iones de calcio al citosol, son
809 útiles para respuestas ambientales en eucariotas, mientas que, en animales, los canales
810 potenciales de calcio actúan como sensores de temperatura, de potencial osmótico y otras
811 condiciones ambientales. Aunque las plantas también responden a un sin número de
812 perturbaciones ambientales con flujos de calcio citosólico por lo que debemos entender que
813 los cambios en el ambiente se ven reflejados en cambios en la concentración intracelular de
814 los iones de calcio (Hou, et al, 2014). Tanto *L. mexicana* como *T. brucei* sufre de cambios
815 ambientales, ya sea, por las quimioterapias o sencillamente por ser sometidos a cambios de
816 temperatura, esto les han llevado adaptarse. En estos parásitos se han conseguidos los dos
817 tipos de canales de calcios el primero presente en animales (tipo L) y ahora evidenciamos que
818 tienen un mismo canal de calcio presentes en las plantas (tipo P).

819

820 En el caso de *Trypanosoma brucei* la bibliografía dice que se deposita directamente en la
821 sangre el cual logra instalarse en el sistema nervioso y poco tiempo después provocando la
822 muerte. Al descubrir este nuevo tipo de canal de calcio ya se pueden diseñar nuevos
823 medicamentos que eviten que este parásito se albergue en el cerebro y se lo pueda eliminar
824 más rápido, aunque como ya mencionamos anteriormente el bloquear estos tipos de canales
825 de calcio podríamos provocar enfermedades como el Parkinson, Alzheimer entre otras.

826

827 Esta proteína posee 10 posibles dominios transmembrana, 9 dominios transmembrana
828 homólogos con *T. brucei* y 7 dominio transmembrana homólogos a *L. mexicana*, tenemos
829 dominios conservados en cuanto a los canales de calcio, por esto es que tenemos regiones
830 homólogas dado que esto nos facilitaría la creación de una vacuna eficiente para estos dos
831 organismos.

832

833 Este trabajo de investigación puede dar paso para la búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos
834 para estas dos enfermedades, más en el caso de la Leishmaniasis que es la enfermedad que más se
835 conoce por ser una enfermedad de países del tercer mundo pero con alta incidencia en países
836 desarrollados.

837

838 **CONCLUSIONES**

839 1.Las hélices transmembrana de nuestros parásitos de estudio como la de la proteína
840 DUF221 superan las 8 hélices transmembrana esto es el primer indicativo de que se trata de
841 un canal de calcio.

842

843 2.*Leishmania mexicana*, *trypanosoma brucei* y la proteína DUF221 tienen una región de
844 unión ha calmodulina.

845

846 3.Ningún tipo de droga se ha suministrado para bloquear el canal de calcio tipo N, P o Q

847 dado que podría ser altamente peligroso ya que se podría desarrollar enfermedades como el

848 Parkinson, alzhéimer entre otras.

849

850 4.La proteína DUF221 se encuentra presente en el organismo humano.

851

852

853

854

855

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

869

870 **Referencias Bibliográficas**

- 871 1. Abenga, J. N. (2014). A comparative pathology of *Trypanosoma brucei* infections.
872 *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Science*, 3(12), 390–
873 399.
- 874 2. Benaim, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G., & Figarella, K. (2013).
875 Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of
876 *Leishmania mexicana*. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(3),
877 1091-1096.
- 878 3. Boelaert, M. (2000). OF THE ROYAL SOCIETY Review Article Visceral
879 leishmaniasis control : a public health perspective. *Tropical Medicine*.
- 880 4. Brun, R., & Balmer, O. (2006). New developments in human African trypanosomiasis.
881 *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 415–420.
882 <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244045.93016.b1>
- 883 5. G, D. (2013). A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of
884 Leishmaniasis. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 4(2).
885 <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000166>
- 886 6. Hoppe, U. C., Brandt, M. C., Michels, G., & Lindner, M. (n.d.). L-Type Calcium
887 Channel Recording. *Practical Methods in Cardiovascular Research*, 324–354.
888 https://doi.org/10.1007/3-540-26574-0_17
- 889 7. Hou, C., Tian, W., Kleist, T., He, K., Garcia, V., Bai, F., ... & Li, L. (2014). DUF221
890 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved
891 across eukaryotes. *Cell research*, 24(5), 632.
- 892 8. Iowa State University/College of Veterinary Medicine. (2009). Leishmaniasis
893 (Cutaneous and Visceral). *Iowa State University*, 1–11. Retrieved from
894 <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>

- 895 9. Morrison, L. J. (2011). Parasite-driven pathogenesis in *Trypanosoma brucei*
896 infections. *Parasite Immunology*, 33(8), 448–455. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01286.x)
897 3024.2011.01286.x
- 898 10. Navarro, M. C., & Lozano, Y. (2016). ¿ESTÁN LOS CLC DE LEISHMANIA
899 ASOCIADOS CON LA ADAPTACIÓN DEL PARÁSITO A CAMBIOS DE pH Y/O
900 DE OSMOLARIDAD? *Acta Biológica Colombiana*, 21(1Supl), 265–277.
901 <https://doi.org/10.15446/abc.v21n1Supl.50591>
- 902 11. Perez-reyes, E., & Schneider, T. (1994). Calcium Channels : Structure , Function , and
903 Classification, 318.
- 904 12. Reimão, J. Q., Mesquita, J. T., Ferreira, D. D., & Tempone, A. G. (2016).
905 Investigation of Calcium Channel Blockers as Antiprotozoal Agents and Their
906 Interference in the Metabolism of *Leishmania (L.) infantum*. *Evidence-Based*
907 *Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
908 <https://doi.org/10.1155/2016/1523691>
- 909 13. Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S.
910 (2007). Review Cutaneous leishmaniasis. *Infection.TheLancet.Com*, 7(September).
911 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- 912 14. Ruiz-Postigo, J. A., Franco, J. R., Lado, M., & Simarro, P. P. (2012). Human African
913 trypanosomiasis in South Sudan: How can we prevent a new epidemic? *PLoS*
914 *Neglected Tropical Diseases*, 6(5), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001541>
- 915 15. Sokabe, T., & Tominaga, M. (2010). The TRPV4 cation channel: A molecule linking
916 skin temperature and barrier function. *Communicative & integrative biology*, 3(6),
917 619-621.
- 918 16. Tyson, J. R., & Snutch, T. P. (2013). Molecular nature of voltage-gated calcium
919 channels: Structure and species comparison. *Wiley Interdisciplinary Reviews:*

- 920 *Membrane Transport and Signaling*, 2(5), 181–206. <https://doi.org/10.1002/wmts.91>
- 921 17. Vera-izaguirre, D. S., Vega-memije, E., Quintanilla-cedillo, M. R., & Arenas, R.
- 922 (2006). Leishmaniasis. *Revisión*, 4(4), 252–260.
- 923 18. Winter, G., Fuchs, M., McConville, M. J., Stierhof, Y. D., & Overath, P. (1994).
- 924 Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of
- 925 glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J. Cell Sci.*,
- 926 107, 2471–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7844164>
- 927
- 928