

ESTUDIO BIOINFORMÁTICO Y DE MODELADO MATEMÁTICO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS FOSFATIDILINOSITOL QUINASAS EN *Leishmania* spp

Valeria Velásquez Zapata

Trabajo de tesis para optar al título de Bióloga

Asesores:

Rodrigo Ochoa Deossa

Carlos Muskus López

Programa para el Estudio y Control de Enfermedades Tropicales - PECET

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN
AGOSTO 2013

ESTUDIO BIOINFORMÁTICO Y DE MODELADO MATEMÁTICO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS FOSFATIDILINOSITOL QUINASAS EN *Leishmania* spp

RESUMEN

La leishmaniasis, causada por el parásito *Leishmania* spp, es una enfermedad de alto impacto en la salud pública, que si no se trata adecuadamente puede llevar a la muerte del paciente que la padece. La Organización Mundial de la Salud en colaboración con diferentes Organizaciones No Gubernamentales (ONGs) la han declarado como prioridad la investigación. El presente trabajo consiste en la búsqueda de blancos de medicamentos contra esta enfermedad, a través de un análisis bioinformático y un modelado matemático de la ruta de señalización del fosfatidilinositol, especialmente de las proteínas PIKs del parásito. Para esto, se caracterizaron todas las proteínas de la ruta, y sus interacciones, a través de diversas herramientas bioinformáticas. Posteriormente, a partir de estos resultados, se propuso un modelo booleano y un modelo lógico dinámico de esta ruta de señalización. Como resultado se muestra una reconstrucción de la ruta, con una descripción detallada de las moléculas asociadas a ésta, y su viabilidad como blancos de medicamentos antileishmania, apoyados además en los resultados obtenidos con la simulación de los modelos matemáticos, que permitieron integrar los elementos, analizar sus interacciones y predecir el efecto de un inhibidor sobre la ruta; destacando la importancia de una comprobación experimental de los hallazgos *in silico*.

Palabras clave: búsqueda de medicamentos, modelado booleano y dinámico de rutas de señalización, análisis de ortología, dominios proteicos.

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
2.1.	Definición del objeto de investigación y formulación del problema	3
2.2.	Justificación	4
3.	MARCO TEÓRICO	5
3.1.	Generalidades de <i>Leishmania spp.</i>	5
3.2.	Ciclo de vida	6
3.3.	Leishmaniasis	6
3.4.	Estrategias de búsqueda de medicamentos	7
3.5.	Quinasas como blancos de medicamentos	10
3.6.	Modelado matemático de redes de señalización	12
3.7.	Los modelos booleanos	14
3.8.	Los modelos lógicos dinámicos	16
4.	HIPÓTESIS	19
5.	OBJETIVOS	20
5.1.	General	20
5.2.	Específicos	20
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1.	Obtención de secuencias	21
6.2.	Búsqueda de dominios	21
6.3.	Alineamiento y análisis filogenético	22
6.4.	Análisis de similitud con las proteínas en humanos	22
6.5.	Construcción del modelo matemático booleano de la ruta	23
6.6.	Evaluación del efecto de un inhibidor sobre la ruta	24
6.7.	Construcción del modelo lógico dinámico	24
7.	RESULTADOS	25
7.1.	Proteínas encontradas y modelos asignados	25
7.2.	Análisis filogenético	32
7.3.	Análisis de ortología y similitud con las proteínas de la ruta del fosfatidilinositol en humanos	35

7.4.	Análisis del modelo booleano de la ruta de fosfatidilinositol en <i>Leishmania</i> spp	37
7.5.	Efecto de un inhibidor en la ruta del fosfatidilinositol.....	40
7.6.	Modelo lógico dinámico de la ruta del fosfatidilinositol en <i>Leishmania</i>	42
8.	DISCUSIÓN	45
9.	REFERENCIAS	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de las proteínas encontradas para la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp con su nombre abreviado y clasificación EC

Tabla 2. Lista de las proteínas encontradas para cada especie de *Leishmania* con su ubicación cromosómica

Tabla 3. Lista de proteínas encontradas con ortólogos en humanos, comparada con la tabla inicial de genes de la ruta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Medicamentos más comunes utilizados contra la leishmaniasis

Figura 2. Esquema de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp, indicando las proteínas encontradas (amarillo para quinasas, verde para fosfatasas, azul para hidrolasas, violeta para transferasas)

Figura 3. Filogenias obtenidas para los genes PI3K, PI4K, PIK y PI(4)5K, asociadas con los modelos de dominios para los clados.

Figura 4. Esquema del modelo cualitativo de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp. Las flechas indican activación, las líneas negras desactivación, los círculos azules conexiones “Y”. Los rombos amarillos las respuestas mediadas por segundos mensajeros y los verdes representan señales de entrada.

Figura 5. Simulación de los eventos tempranos de la ruta del fosfatidilinositol. Se muestra la activación de las especies en azul (1) y la desactivación en rojo (0). Los inputs se muestran en verde.

Figura 6. Simulación de los eventos tardíos de la ruta del fosfatidilinositol. Se muestra la activación de las especies en azul (1) y la desactivación en rojo (0). Los inputs se muestran en verde.

Figura 7. Matriz de dependencia entre las especies relacionadas en el modelo cualitativo. En verde se muestra la activación, en rojo la inhibición y en amarillo ambos.

Figura 8. Efecto sobre la ruta del fosfatidilinositol en la inhibición de las proteínas PTEN e IP3(5)phos.

Figura 9. Simulación del modelo lógico dinámico 1 de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania*.

Figura 10. Simulación del modelo lógico dinámico 2 de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania*.

LISTA DE ANEXOS

Tabla A1. Clasificación de los dominios encontrados en las proteínas de la ruta del fosfstidilinositol en *Leishmania* separándolos por el gen que los posee

Tabla A2. Resultado Delta-Blast de las proteínas de la ruta contra las proteínas en humanos, mostrando valores como el porcentaje de identidad y el valor E

Figura A1. Árboles obtenidos a partir del análisis bayesiano de las proteínas de la ruta del fosfatidilinositol asociadas a los dominios encontrados en cada una

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad con alto impacto en la salud pública, se estima que es causada por 20 especies patógenas para los seres humanos, pertenecientes al género *Leishmania*, y transmitida por la picadura de flebótomos (1). La leishmaniasis en la actualidad amenaza a 350 millones de personas en 98 países de todo el mundo. Los síntomas clínicos causan una lesión que puede ser cutánea, mucocutánea o visceral, dependiendo de la especie de *Leishmania* (1,2), los cuales van desde lesiones en la piel y destrucción de las mucosas, hasta compromiso del hígado, bazo y médula ósea, produciendo síntomas como anemia, problemas de coagulación, fiebre, etc., la cual si no se trata adecuadamente y a tiempo puede causar la muerte.

Durante muchos años, el impacto en la salud pública de la leishmaniasis ha sido muy subestimado, principalmente debido a la falta de conciencia de sus graves consecuencias en la salud. En los últimos diez años, las regiones endémicas se han extendido, y ha habido un fuerte incremento en el número de casos registrados de la enfermedad (1). La Organización Mundial de la Salud en colaboración con diferentes Organizaciones No Gubernamentales (ONGs) han declarado como prioridad la investigación en el descubrimiento y desarrollo de nuevos tratamientos antileishmania que sean accesibles, seguros, eficientes, de corta duración, fáciles de administrar y a un costo razonable, para mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad.

Una de las estrategias desarrolladas para la búsqueda de nuevos medicamentos consiste en el establecimiento de vías metabólicas que faciliten un análisis bioquímico detallado, permitiendo identificar blancos específicos que sirvan como dianas moleculares para estos medicamentos (4, 5, 6). Resultados previos han encontrado que en los últimos años la vía del metabolismo de fosfatidilinositol (PI) se ha propuesto para el desarrollo de medicamentos en diversas enfermedades, incluyendo la leishmaniasis (7, 8, 9, 10, 11). Además, esta ruta se encuentra descrita en gran porcentaje, en bases de datos como KEGG (11), lo cual provee una ventaja sobre otras rutas utilizadas en este tipo de trabajos, ya que los datos son muy limitados. Por lo tanto, a partir de esta información es posible entonces, proponer un análisis bioinformático de las proteínas pertenecientes a la ruta de señalización, especialmente aquellas que están encargadas de la activación de los fosfatidilinositolles (la familia PIK), por su gran importancia en la generación de una

señal específica dentro de la red. También es posible además, plantear un modelo matemático que describe las interacciones de los elementos que pertenecen a las vías, y que predice los posibles efectos en alteraciones de las mismas, como es el efecto de un inhibidor (que representa la acción de la mayoría de medicamentos en múltiples enfermedades). Un modelo matemático, permitiría la simulación de la ruta del fosfatidilinositol, proporcionando una herramienta muy poderosa para analizar una ruta como ésta y facilitaría la identificación de blancos moleculares de medicamentos contra la leishmaniasis, que es justamente lo que se busca con este trabajo.

2. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1. Definición del objeto de investigación y formulación del problema

La leishmaniasis es una enfermedad a la cual no se le ha prestado la atención necesaria para implementar un tratamiento adecuado. Ésta es causada por un parásito (*Leishmania* sp.) que se transmite por la picadura de flebótomos; los síntomas dependen de la especie de *Leishmania* que origina la enfermedad y la forma de tratamiento presenta diversas dificultades que hacen que sea un problema esencial para la medicina de los países que la padecen.

Los medicamentos más utilizados actualmente para el tratamiento están basados en antimonio pentavalente junto con la anfotericina B, el isotianato de pentamidina y la miltefosina. Sin embargo, éstos tienen un alto costo, requieren altas dosis que pueden llegar a ser tóxicas para el paciente, además de que presentan tiempos de tratamiento muy largos que favorecen que el paciente no los termine, permitiendo a su vez el desarrollo de cepas del parásito resistentes al fármaco (12).

La poca o ninguna motivación que tiene la industria farmacéutica para invertir en la investigación y desarrollo de medicamentos para la leishmaniasis ha llevado a que esta enfermedad se incluya en el grupo de las enfermedades huérfanas o desatendidas. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud en colaboración con diferentes Organizaciones No Gubernamentales (ONGs) han declarado como prioridad la investigación en el descubrimiento y desarrollo de nuevos tratamientos. Lo anterior, enfatiza la importancia de buscar nuevos medicamentos que sean efectivos y seguros en el manejo de la enfermedad. Lo que nos lleva a preguntarnos: ¿Será posible proponer un nuevo medicamento más eficiente y seguro mediante el uso de herramientas bioinformáticas que utilicen la información de rutas de señalización, las secuencias de las proteínas involucradas, y el análisis matemático de la cinética de la misma?

2.2. Justificación

Las graves consecuencias en la salud que la leishmaniasis ocasiona no es equiparada con un esfuerzo adecuado en el tratamiento de la misma, posiblemente porque los países que sufren la enfermedad corresponden a poblaciones con bajos recursos en investigación como Colombia, en los cuales, si no se trata, la tasa de mortalidad en leishmaniasis visceral puede ser tan alta como del cien por ciento (13). Debido a esto, se ha declarado como prioridad la búsqueda de nuevas medidas de control o buscar nuevas alternativas terapéuticas que sean accesibles, seguras, eficientes, de corta duración, fáciles de administrar y a un costo razonable, para mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad. Una de las formas que se han planteado como posible solución a uno de los problemas en el control de la enfermedad consiste en el diseño racional de medicamentos, el cual implementa herramientas que utilizan la información estructural y funcional de las moléculas involucradas por ejemplo, en un mecanismo reconocido de la enfermedad, para proponer nuevos blancos y a su vez analizar qué tipos de inhibidores se ajustan de una mejor manera a ellos.

Una de las familias de proteínas de *Leishmania* interesantes de evaluar en la búsqueda de blancos terapéuticos corresponde a las fosfatidilinositol quinasas (PIKs), que constituyen la ruta de señalización del fosfatidilinositol en eucariotas. Existe evidencia suficiente para proponer estas proteínas como nuevos blancos terapéuticos y/o como vacunas contra la leishmaniasis: en primer lugar el hecho de que procesos tan fundamentales en *Leishmania spp.* como la transducción de señales y la invasión al huésped estén dirigidos por este grupo de proteínas; en segundo lugar el que actualmente investigaciones en enfermedades como el cáncer que se encuentran en prioridad a nivel mundial, estén apostando por éstas como blancos; y en tercer lugar la existencia de medicamentos probados que actualmente son utilizados (wortmannin y la rapamicina) como bloqueadores de la vía y la vía del TOR (que corresponde a un grupo de quinasas relacionadas con PIKs) en otros trypanosomátidos como *T cruzi* (14).

De esta manera, se contribuiría a la optimización de la búsqueda y la proposición de nuevos medicamentos que sean más específicos, no presenten efectos secundarios, tengan más fácil acceso y administración, medicamentos que mejoren la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad que justamente pertenecen a poblaciones vulnerables, con menores recursos y menor calidad en la salud.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de *Leishmania spp.*

Los protistas pertenecientes a la clase Kinetoplastida y particularmente a la familia Trypanosomatidae son de gran importancia en parasitología. En esta familia se incluyen doce géneros de protozoos flagelados, parásitos obligados de un amplio espectro de organismos (12). El orden Kinetoplastida se caracteriza por comprender organismos con la presencia de uno o dos flagelos procedentes de la estructura de la membrana celular, llamada bolsillo flagelar, que está asociada con la actividad de endocitosis y secreción de proteínas. Este grupo de microorganismos se caracteriza porque presenta una sola mitocondria de gran tamaño, que contiene una región definida rica en ADN llamada el kinetoplasto (12). De los géneros pertenecientes a esta familia, existen algunos que completan su ciclo de vida en un solo huésped (parásitos monoxenos), mientras que otros géneros lo hacen en más de un huésped (parásitos heteroxenos). Los tripanosomátidos heteroxenos son transmitidos a sus huéspedes vertebrados por insectos, pero en contraste con los fuertes efectos que causan en los primeros, la mayoría de las asociaciones no afectan a su insecto vector (12).

Los miembros de la familia Trypanosomatidae tienen una alta diversidad morfológica que depende de la fase de su ciclo de vida y las interacciones biológicas con el entorno en el que se encuentran. Las principales formas morfológicas de los tripanosomátidos son las siguientes: amastigote, promastigote, opistomastigote, epimastigotes, trypomastigote y choanomastigota (restringido al género *Crithidia*). La forma de algunas de sus organelas como el flagelo, la bolsa flagelar, el kinetoplasto y el núcleo son fundamentales para la caracterización morfológica (12).

El género *Leishmania* corresponde a un grupo de organismos dentro de la familia Trypanosomatidae. Hay más de 20 especies y subespecies conocidas y prevalentes en 98 países de todo el mundo que se agrupan geográficamente en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa) y el nuevo mundo (América). La leishmaniasis es un grupo de enfermedades transmitidas a los mamíferos por la picadura de las hembras del género *Lutzomyia spp* en el Nuevo Mundo o *Phlebotomus spp.* en el Viejo Mundo (1) durante la ingestión de sangre necesaria para madurar sus huevos.

3.2. Ciclo de vida

Los parásitos pertenecientes al género *Leishmania* poseen un ciclo de vida bifásico de alta complejidad, el cual se desarrolla entre su vector (flebotomos) y su huésped (mamífero). *Leishmania* en la naturaleza se encuentra básicamente como dos estadios, uno de amastigotes, que es la forma causante de la patología en el hospedero vertebrado y la forma promastigote, que es el estadio presente en el insecto vector. Después de la transferencia de los promastigotes en el huésped por la picadura del insecto, *Leishmania* invade los macrófagos del huésped y vive dentro del compartimiento fagocitosomal de estas células. Como aumenta el número de parásitos, el macrófago muere eventualmente por su liberación, mientras que los parásitos liberados van a infectar a otros macrófagos. Este proceso continúa hasta que el mamífero infectado es picado por otro insecto y los amastigotes salen de los macrófagos que ha ingerido éste, diferenciándose en promastigotes procíclicos, volviendo al inicio del ciclo de vida (15).

3.3. Leishmaniasis

La leishmaniasis es la enfermedad producida por la transmisión de *Leishmania* sp. a través de un insecto vector. Se estima que potencialmente 350 millones de personas corren el riesgo de infección y 12 millones están infectadas alrededor del mundo (12). Existen varios tipos de leishmaniasis, las cuales se encuentran asociadas con la especie que es responsable de la infección.

Una de ellas es la leishmaniasis cutánea (LC), que produce un gran número de lesiones o úlceras en la piel que normalmente se forman en las áreas expuestas, tales como la cara, brazos y piernas, que por lo general se curan en pocos meses, dejando al paciente con cicatrices permanentes (16). Este tipo de leishmaniasis se puede clasificar en varias formas: leishmaniasis cutánea difusa que es causada por *L. aethiopica*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*, resultando en lesiones cutáneas ampliamente distribuidas y crónicas, que pueden cubrir todo el cuerpo de un individuo (16). Esta forma de la enfermedad es difícil de tratar y los pacientes requieren de un tratamiento para curarse. Otro tipo es la leishmaniasis cutánea localizada que es causada por todas las especies de *Leishmania*; un pequeño eritema se desarrolla en el sitio de la picadura del vector, que se transforma

en una pápula y luego un nódulo que progresivamente se convierte en una lesión ulcerosa de la piel. Las lesiones suelen sanar por sí solas en un rango de 2-6 meses (16).

La Leishmaniasis mucocutánea (LMC) es otro tipo, causada principalmente por *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Esta enfermedad provoca lesiones que pueden destruir las membranas mucosas parcial o totalmente (cavidades de la nariz, la boca y la garganta y los tejidos circundantes). Es difícil de diagnosticar y tratar esta forma de la enfermedad (1), causando infecciones secundarias bacterianas comunes, las cuales eventualmente pueden llegar a ser fatales (16).

Por otro lado se encuentra la leishmaniasis visceral (LV), la que es causada por *L. donovani* y *L. infantum*. También es conocida como kala-azar, la forma más grave de la enfermedad. Se caracteriza por síntomas que incluyen fiebre alta, pérdida de peso sustancial, agrandamiento del hígado y el bazo, y otros efectos secundarios como anemia y diarrea. Si no se trata la enfermedad tiene una tasa de mortalidad del 100% en un lapso de dos años (1). Como una complicación de la leishmaniasis visceral se puede presentar una leishmaniasis tipo post-kala-azar que se caracteriza por una erupción de la cual la forma más común es una erupción nodular. Esta forma de la enfermedad ha sido descrita en la India y el Sudán en los pacientes que se han recuperado de la leishmaniasis visceral. La erupción se origina en la boca y luego se disemina a otras partes del cuerpo dependiendo de la gravedad (1).

3.4. Estrategias de búsqueda de medicamentos

Actualmente los tratamientos disponibles para la leishmaniasis están lejos de ser los adecuados e ideales. La demanda de nuevos medicamentos anti-*Leishmania* ha sido impulsado por la resistencia adquirida por los parásitos a los medicamentos existentes (antimonios pentavalentes principalmente) (17) y por los severos efectos adversos que ocasionan en algunas personas. Los medicamentos basados en el antimonio pentavalente se introdujeron en 1945 y todavía se usan como tratamientos efectivos para algunas formas de leishmaniasis (17); sin embargo, el desarrollo de medicamentos anti-*Leishmania* es primordial. Los medicamentos usados para el tratamiento de la leishmaniasis incluyen al estibogluconato de sodio antimonio pentavalente (Pentostam), el

antimoniato de meglumina (Glucantime), también se incluyen la anfotericina B, la pentamidina (17), la paromomicina, y el más reciente, el miletfosine (ver figura 1).

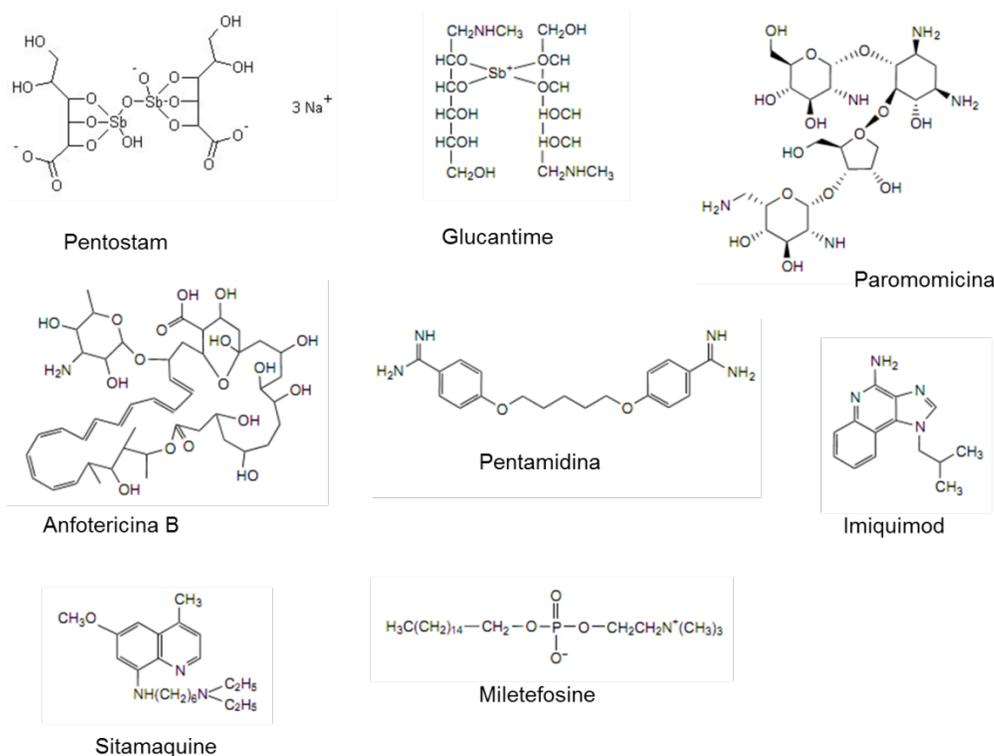


Figura 1. Medicamentos más comunes utilizados contra la leishmaniasis

Las estrategias de búsqueda y diseño de medicamentos involucran desde metodologías tradicionales hasta sofisticados análisis estructurales. En el pasado, la mayoría de los medicamentos existentes se habían descubierto mediante la identificación del ingrediente activo a partir de remedios tradicionales o por descubrimiento fortuito. A medida que la comprensión de las enfermedades ha aumentado desde el punto de vista molecular y de los mecanismos de acción, entonces ha sido posible proponer y diseñar compuestos que modulan específicamente las moléculas (1). El proceso de descubrimiento de fármacos implica la identificación de candidatos, su síntesis, su caracterización, selección y ensayos de eficiencia terapéutica. Una vez que el compuesto ha demostrado su valor en estas pruebas, comenzará el proceso de ensayos clínicos, tomándose un proceso que puede durar años. A pesar de los avances en la tecnología y la comprensión de los sistemas biológicos, el descubrimiento de fármacos sigue siendo un proceso largo, costoso, difícil e ineficaz en muchas ocasiones (18).

Una de las formas de ayudar a resolver el problema es mediante el empleo de metodologías de alto rendimiento (high-throughput screening –HTS–), en donde grandes bibliotecas de compuestos químicos se analizan para determinar su capacidad para modular un blanco, teniendo en cuenta que no tenga una reacción cruzada. A partir de estos análisis es posible entonces tener estructuras base que luego pueden ser modificadas para aumentar su eficiencia como moduladores (19).

Otro método importante para el descubrimiento de fármacos es el diseño racional de medicamentos, donde las propiedades biológicas y físicas del blanco se estudian para hacer una predicción de los tipos de productos químicos que podrían modularlo (por ejemplo encajar en un sitio activo). Metodologías como el docking, análisis de secuencia de proteínas, identificación de dominios, predicción de estructura terciaria, consulta en las bases de datos y análisis de familias de proteínas apoyan el diseño racional de drogas y optimizan la elección de candidatos para los blancos elegidos (19–22). El docking definido como un método de acoplamiento que predice la orientación más probable de una molécula hacia otra cuando se unen entre sí para formar un complejo estable. El conocimiento dicha interacción y su carácter estérico son ampliamente utilizados para predecir la resistencia de una asociación o de la afinidad de unión entre una molécula candidata para fármaco y su proteína blanco, jugando un papel importante en el diseño racional de medicamentos. Por lo anterior se han realizado enormes esfuerzos hacia la mejora de los métodos y algoritmos utilizados, sin embargo muchos comparten metodologías comunes con extensiones nuevas, y la diversidad de la complejidad computacional y la velocidad, proporciona una gran cantidad de técnicas para abordar la búsqueda de medicamentos basada en información estructural (23). Otras metodologías como el BLAST y los alineamientos permiten comparar e identificar la similitud entre una serie de secuencias, y así identificar en el caso de secuencias de proteínas, dominios y secciones conservadas para encontrar relaciones funcionales entre ellas y proponer posibles hipótesis evolutivas sobre su origen, mediante un análisis filogenético.

Este tipo de análisis han permitido entonces identificar familias de proteínas y rutas de señalización que están involucradas en un gran número de enfermedades o que son parte vital del ciclo de vida de microorganismos, convirtiéndolas en excelentes candidatas para blancos del diseño de medicamentos, conociendo su función y posible origen. Una de dichas familias corresponde a las quinasas, que son de gran importancia ya que actúan y

controlan una gran cantidad de procesos biológicos entre ellos rutas de señalización, además de su alta especificidad.

3.5. Quinasas como blancos de medicamentos

Las proteínas quinasas (PK), constituyen una familia de enzimas que a través de la fosforilación del sustrato, regulan su actividad, ubicación y su función (12). Las proteínas quinasas constituyen aproximadamente el 30% de todas las proteínas eucariotas. Pueden actuar para controlar procesos celulares como el metabolismo, la transcripción, la progresión del ciclo celular, la reorganización de citoesqueleto, movimiento celular, la apoptosis y la diferenciación (12). Las quinasas de origen eucariota se pueden dividir en dos subfamilias de acuerdo a los residuos que actúan en el sitio activo, que son: las serin-treonin quinasa y la tirosina quinasa (12). Los dominios catalíticos de estas proteínas se encuentran muy conservados, compuesto aproximadamente por 300 aminoácidos.

Hablando particularmente de las familias de quinasas de tripanosomátidos, análisis genómicos de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* mostraron la existencia de 156, 171 y 179 PK respectivamente. El número de quinasas en tripanosomátidos es aproximadamente dos veces mayor que en *Plasmodium falciparum* y aproximadamente 33% mayor que en *Saccharomyces cerevisiae* (14).

Los inhibidores de las PKs ya han sido considerados como blancos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer (1). Estos inhibidores se pueden clasificar en tres grupos principales: específicas sustrato-inhibidores, inhibidores de activación e irreversibles (1). Un inhibidor ideal que impide la activación una proteína quinasa debe competir con el ATP o con el sustrato. Un ejemplo de este inhibidor es Gleevec que, por la unión a proteínas, induce un cambio conformacional que imita la unión del sustrato. Sin embargo, la mayoría de los inhibidores actualmente en ensayos clínicos son competidores por el sitio de unión del ATP. Actualmente el uso clínico Gleevec está indicado para el tratamiento de unos tipos de leucemias, con un mecanismo sobre tirosina quinasas (14).

En evaluaciones de algunos inhibidores de PK (staurosporine un inhibidor de serin-treonin quinasas, genistein un inhibidor de tirosin quinasas y wortmannin inhibidor de PIK 3) en el crecimiento y la ultraestructura de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y en efectos

intracelulares en amastigotes encontraron que todos inhibieron el crecimiento de epimastigotes, siendo el wortmannin el que lo hizo a menores concentraciones; también tuvieron fuertes efectos en la ultraestructura como condensación anormal de la cromatina, membrana flagelar con ampollas, división celular incompleta y formación de autofagosomas. No tuvieron efecto en la división de los amastigotes ni en su diferenciación (10).

Dado el éxito del uso de inhibidores de la PK en el tratamiento de diferentes patologías y la dilucidación de rutas de señalización de quinasas como las fosfatidilinositol quinasas en tripanosomátidos, entonces estas proteínas PIKs se perfilan como buenos candidatos para la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. Éstas y sus productos (fosfoinosítoles) han demostrado jugar un papel decisivo en una amplia gama de procesos celulares, tales como el crecimiento celular, la supervivencia de la célula, el transporte de vesículas, la reorganización del citoesqueleto y la quimiostais (7, 8, 2, 9, 10).

Así, por ejemplo, las fosfatidilinositol quinasas 3 (PI3K) se le han atribuido funciones intracelulares mediante la acción de su producto, el PI(3,4,5)P₃, un conocido segundo mensajero que se une a proteínas como PKB y Akt (6). Otro grupo, PI4K, se les asocia además con funciones en la morfología celular, de vacuolas y del aparato de Golgi, además de funciones secretoras. Uno de los productos de estas proteínas, PI(4)P, es requerido para la viabilidad celular, activando la ruta Rho1/Pkc1 a través de MAP quinasas, regulando la vía PKC y la organización del citoesqueleto (21, 2).

Esta familia de proteínas incluye otras como la enzima fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa, la cual cataliza una reacción que produce PI(4,5)BP, el cual puede ser catalizado por la fosfolipasas C (PLC) y formando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), importantes segundos mensajeros en la ruta de liberación de Calcio y unión a múltiples factores de transcripción (27); además este producto puede ser tomado por PIK 3 produciendo PI(3,4,5)triP activando varios factores de crecimiento; también se ha encontrado que juega un papel importante en el proceso de exocitosis (24, 25). Además, existen proteínas PIK relacionadas, las cuales se caracterizan por tener dominios relacionados conservados. Proteínas como ATM, Atr y DNA PKC pertenecen a este grupo y son activadas ante daños en el DNA, por los check-points del ciclo celular (2).

Pertenecen a este grupo, proteínas que regulan el crecimiento celular (TOR) y la estructura de la cromatina (TRRAP).

Como ejemplo de posibles medicamentos cuyos blancos son esta familia de proteínas está el wortmannin, un metabolito extraído del hongo *Penicillium funiculosum*, es un inhibidor específico, covalente de PI3Ks. Presenta una potencia similar in vitro para las clases I, II, III y los miembros de PI3K, aunque también puede inhibir otras enzimas relacionadas con la PI3K como mTOR, DNA-PK, algunas PIK4s. Wortmannin es un reactivo de biología celular comúnmente utilizado para inhibir la reparación del ADN, endocitosis mediada por receptor y la proliferación celular. Estudios de mutagénesis dirigida han revelado que este compuesto se une covalentemente a una lisina en el dominio PIK de las PIKs. Este residuo de lisina se encuentra en el sitio de unión a ATP del dominio catalítico, y por lo tanto juega un papel indispensable en la reacción de fosforilación. Además se ha encontrado que tiene potencial como agente antiinflamatorio y en tratamientos contra el cáncer (2).

3.6. Modelado matemático de redes de señalización

Actualmente se ha recopilado gran información sobre moléculas involucradas en señalización celular, así la construcción de modelos de rutas de señalización se convierte en un proceso clave para la comprensión de la información recopilada y eventualmente sobre la regulación de múltiples procesos celulares. En el nivel topológico, muchas rutas se han identificado en detalle y han sido depositadas en bases de datos como la enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG) (11). Sin embargo, nuestra comprensión de su lógica subyacente y el funcionamiento es todavía incipiente.

Los modelos matemáticos son una poderosa herramienta para el análisis de sistemas biológicos complejos. Se han utilizado ampliamente para estudiar las redes metabólicas, resultando en una teoría que describe en términos cuantitativos el papel de las enzimas en la regulación de los flujos de la vía y las concentraciones de metabolitos. El modelado es útil para describir los datos experimentales, deducir los principios reguladores, y para la comprensión de fenómenos dinámicos más complejos como las oscilaciones de las rutas (29). Pese a todo esto, el modelado de los sistemas de transducción de señales se encuentra en sus primeras etapas, comenzando por el hecho que en muchos casos los

datos experimentales de la cinética no están disponibles, pero incluso sin éstos, los modelos matemáticos pueden mejorar nuestra comprensión de los principios reguladores y además ayudar a identificar los principales parámetros que definen la cinética de estas reacciones.

Existen varios ejemplos de modelos implementados en rutas de señalización para explorar la dinámica de las mismas. Al nivel de proteínas quinasas, se han estudiado sistemas como las MAP quinasas, en las cuales se han estudiado los efectos de una retroalimentación negativa en la generación de la adaptación de la señal, un término que se refiere al restablecimiento de una señal por una pre-estimulación. Adicionalmente este modelo permitió la observación de la adaptación a la señal en varios niveles de la cascada de señalización, y examinar la importancia de procesos como la comunicación entre diferentes vías de señalización (30).

Los modelos bioquímicos pueden construirse en varios niveles de detalle. El más detallado es el modelo estocástico, el cual siguen en cada momento la cantidad de cada tipo de molécula. Tales modelos pueden ser muy útiles si el número macromoléculas es bajo, por ejemplo, sólo unas decenas de moléculas o de factores de transcripción específicos o mRNAs pueden estar presentes. Entonces, las variaciones temporales se analizan a nivel de moléculas individuales a través de su creación o destrucción en una forma aleatoria (31). La falta de datos experimentales requeridos en la elaboración de estos modelos, limitan su aplicación.

Otro tipo de modelos describen las variables de una forma continua o dinámica, no números discretos como en modelos estocásticos. A este nivel de detalle los modelos utilizan ecuaciones diferenciales de las tasas de cambio de la concentración de las moléculas, las cantidades conocidas corresponden a datos de la cinética como tasas, constantes cinéticas de Michaelis, actividad enzimática, entre otras (31).

Por medio de simulaciones y aproximaciones numéricas se integran las ecuaciones diferenciales para seguir las concentraciones en el tiempo, y comparar los resultados con los datos experimentales. También es posible además, ajustar los valores de los parámetros para que optimicen la simulación. Finalmente, si se carece de datos experimentales o son muy incompletos, un enfoque booleano es adecuado. Aquí, los

genes o las enzimas son simplemente considerando como interruptores que se encuentran en un estado prendido o apagado. Este tipo de enfoque ha sido utilizado para modelar el cambio de la actividad de un gran número de genes durante el desarrollo o la diferenciación celular (31).

Otra distinción importante es entre los tipos de modelos incluyen su carácter cualitativo o cuantitativo. Los modelos cuantitativos, describen la estructura y el comportamiento de rutas bioquímicas específicas; en contraste, los modelos cualitativos que generalmente tienen un menor número de ecuaciones y se construyen para representar la bioquímica general de las múltiples vías y elementos como la retroalimentación, las fluctuaciones aleatorias en el número de moléculas, y la formación de complejos que contienen enzimas o factores de transcripción. Por lo general, es deseable construir el modelo más simple capaz de capturar las características del sistema, las más relevantes para la hipótesis que está siendo probada. Tal modelo debe contener características esenciales, sin la adición de detalles irrelevantes (31). Luego de que se realiza la construcción del modelo se realiza la validación, la cual comienza con la búsqueda y extracción de información útil a partir de la literatura. A fin de desarrollar un modelo cinético con poder de predicción alto, es necesario además de describir en detalle el mecanismo de acción de cada enzima en la ruta, el asociar a él diversos tipos de datos experimentales.

3.7. Los modelos booleanos

En el estudio de rutas de señalización, donde no existe información detallada para aplicar leyes cinéticas precisas para cada reacción bioquímica, y donde sólo se dispone de información cualitativa acerca de las interacciones (como "A inhibe B"), se propone una solución que consiste en la aplicación de los modelos booleanos. A pesar de su simplicidad, los modelos booleanos proporcionan información valiosa sobre la dinámica general (32). Para la reconstrucción y el análisis cualitativo de este tipo de modelos, es necesaria la construcción de un gráfico de interacción o modelo cualitativo, en el cual se asigna a las moléculas involucradas la calidad de nodos conectados por interacciones equivalentes a las reacciones, que pueden activar (un estado "on", denotado como 1) o desactivar (un estado "off", denotado como 0) cada nodo con unas reglas lógicas básicas que se describirán más detalladamente.

La señal de la red se forma a través de secciones: de entrada o “input”, intermedia y de salida o “output”. La señal de entrada se puede modificar para ver las variaciones en la respuesta de la red, y observar en este caso la activación o desactivación de las proteínas de interés, además de la familia de los fosfatidilinositoles que son importantes por sus funciones como segundos mensajeros. En una red booleana, los nodos representan las especies (por ejemplo, quinasas, estímulos externos de activación de la ruta, fosfatasas, y los fosfatidilinositoles). Cada uno presenta estado lógico asociado al correr el modelo, con un resultado binario que se calcula con a partir de las relaciones del modelo cualitativo: por ejemplo se sabe que el segundo mensajero PI3P es producido por la fosforilación de la quinasa PI3K subclase 1 y que se desactiva o defosforila por la acción de la fosfatasa PTEN, de esta manera mediante un conector lógico de intersección como lo es “Y” es posible mostrar dicha interacción (ver figura 3).

Desde el punto de vista matemático cada interacción se expresa con un lenguaje que representa y formaliza la red de una manera adecuada, con el uso de los operadores booleanos “Y” (?), O (+), y NO (!), que son suficientes para representar cualquier relación lógica. Un evento de señalización (o interacción) en un LIH (logical interaction hypergraph) es una conexión que involucra a varios nodos y muestra cómo se da la activación o desactivación; en el caso más simple se encuentra una interacción de activación uno a uno, es decir una molécula activa a otra, por ejemplo, la activación por fosforilación de una quinasa. Este tipo de interacción es representada con una flecha como se muestra en el modelo cualitativo (33,34).

Existen otros casos en los que los hiperarcos son más complejos, como el caso de una molécula que puede ser activada por más de una molécula, o que es activada por una y desactivada por otra; entonces esos eventos de señalización son O-conectados, es decir, se representan con mediante la convergencia de las interacciones entre las especies implicadas, mediante un conector tipo “O” y distinguidos según su efecto de inhibición o activación (34,35).

Este tipo de modelos permiten además, introducir el efecto temporal en la ruta para apreciar y diferenciar eventos tempranos de tardíos, asignándole un tiempo t a cada reacción (1 para eventos tempranos y 2 para tardíos), haciendo posible ver las

activaciones transitorias de la rutas y las inactivaciones que se presentan al encender las fosfatasas, volviendo a un estado basal de la misma y evitando bucles de retroalimentación (33).

3.8. Los modelos lógicos dinámicos

En la descripción y modelado de las redes de señalización existen también los enfoques dinámicos, que normalmente se basan en la construcción de ecuaciones diferenciales, proporcionando detalles bioquímicos de la cinética de las reacciones (36). Los modelos más utilizados son sistemas de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas que describen el desarrollo del sistema en el tiempo, utilizando la cinética de acción de masas para describir las tasas de producción y consumo de las especies. Este tipo de modelos requiere un conocimiento suficiente de los mecanismos lógicos y los parámetros cinéticos, lo que limita su aplicabilidad a las redes pequeñas y bien caracterizadas (32,37).

Los métodos de modelado cualitativos se basan principalmente en la estructura de la red y no requieren información sobre los parámetros cinéticos. Esto hace que sean generalmente aplicables a redes de gran escala. Esta clase de modelos comprenden formalismos de diferente complejidad: los modelos más sencillos incluyen gráficas que representan las especies como nodos y las interacciones entre ellas como puentes; ellos se han aplicado en el estudio de topológico de las propiedades de las redes, que pueden contener hasta varios miles de proteínas (38,39).

Además, los modelos lógicos se pueden utilizar para estudiar la dinámica del sistema, en un sentido cuantitativo. Con el fin de obtener modelos que son capaces de explicar y predecir el comportamiento cuantitativo y dinámico del sistema, los modelos lógicos pueden ser transformados en modelos de EDO de una manera directa. En contraste con los modelos dinámicos que se basan en descripciones mecanicistas de la bioquímica de la red, estos modelos basados en lógica pueden ser vistos como una representación continua de la biológica cualitativa. Como tales, éstos pueden ser utilizados para modelar rutas que no poseen información detallada (38).

Es así como se genera una alta correlación entre los gráficos de interacción, los modelos

lógicos y los modelos lógicos dinámicos, ya que cada uno de ellos tiene un gráfico de interacción subyacente. Por lo tanto, estos tres enfoques ofrecen la opción para conducir una estrategia de modelado: inicialmente la información consignada en bases de datos y en la literatura puede ser representada en un gráfico de interacción o modelo cualitativo; la transformación a los modelos lógicos permite hacer simulaciones discretas y finalmente, la derivación de ecuaciones diferenciales ordinarias basadas en el modelo lógico booleano, que conllevan a contrastar la información biológica cualitativa con los datos experimentales cuantitativos modelados en el tiempo (37,38).

Mediante el software Odefy (37) es posible realizar la transformación de una red booleana en un modelo dinámico de EDO, tomando la ecuación general de la red booleana en un sistema de ecuaciones diferenciales, así:

$$x_i(t+1) := B_i(x_{i1}(t), x_{i2}(t), \dots, x_{iN_i}(t)) \in \{0, 1\}, \quad i = 1, 2, \dots, N.$$

Donde N es el número de especies X_i , que toman un valor x_i [0,1], y que determina su valor $X_i(t+1)$ de acuerdo a los valores de las especies $X_i(t)$ y de la función B_i .

En la siguiente ecuación:

$$\dot{\bar{x}}_i = \frac{1}{\tau_i} (\bar{B}_i(\bar{x}_{i1}, \bar{x}_{i2}, \dots, \bar{x}_{iN_i}) - \bar{x}_i).$$

Donde se muestra la tasa de producción de la especie X_i en un tiempo t , mediante una ecuación de decaimiento de primer orden, determinada por el tiempo de vida de la especie i (τ_i).

Ahora, en el programa Odefy existen tres métodos para transformar la función booleana inicial en la función que describe la producción de las especies de la ruta, llamados Boolecube, Hillcube y Hillcube Normalizado, dados por las siguientes ecuaciones:

$$\bar{B}^1(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_N) := \sum_{x_1=0}^1 \sum_{x_2=0}^1 \dots \sum_{x_N=0}^1 \left[B(x_1, x_2, \dots, x_N) \cdot \prod_{i=1}^N (x_i \bar{x}_i + (1-x_i)(1-\bar{x}_i)) \right] \quad \boxed{\text{Boolecube}}$$

$$\bar{B}^H(\bar{x}_1, \dots, \bar{x}_N) := \bar{B}^1(f_1(\bar{x}_1), \dots, f_N(\bar{x}_N)), \quad \boxed{\text{Hillcube}}$$

$$f(\bar{x}) - \bar{x}^n / (\bar{x}^n + k^n)$$

Con $f(x)$ una ecuación de Hill

$$\bar{B}^{\text{Hn}}(\bar{x}_1, \dots, \bar{x}_N) := \bar{B}^1 \left(\frac{f_1(\bar{x}_1)}{f_1(1)}, \dots, \frac{f_N(\bar{x}_N)}{f_N(1)} \right),$$

Hillcube normalizado

De esta manera, mediante métodos numéricos es posible aproximar estas ecuaciones y finalmente transformar los modelos e implementar el factor dinámico en una red booleana, a través del uso de plataformas como Matlab o Octave.

4. HIPÓTESIS

El análisis matemático y bioinformático de la vía de señalización del PI en los procesos celulares del parásito *Leishmania* permitiría la selección racional de nuevos medicamentos contra esta enfermedad.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Analizar la ruta del metabolismo del fosfatidilinositol, principalmente las PIKs y enzimas relacionadas, empleando herramientas bioinformáticas y de modelación matemática, que permitan la identificación de un blanco farmacológico contra la leishmaniasis.

5.2. Específicos

- Realizar la reconstrucción empleando un modelo cualitativo de la ruta de señalización del fosfatidilinositol para las especies de *Leishmania* que tengan disponibilidad en las bases de datos.
- Encontrar las relaciones filogenéticas para cada proteína perteneciente a la ruta entre las especies analizadas.
- Realizar análisis de similitud de las proteínas con sus homólogos en humanos.
- Proponer un modelo matemático (tomado como una aproximación) que simule la cinética de la ruta en cada paso.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención de secuencias

Con el fin de obtener todas las proteínas relacionadas a la ruta de señalización del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp se realizó una búsqueda de éstas en la base de datos KEGG (11). Con esta información inicial se buscaron estas proteínas en la base de datos TriTrypDB (versión 4.0) (40) y la herramienta de alineamiento local BLAST (41) del NCBI, para comprobar las proteínas relacionadas en cada una de las especies de *Leishmania* con secuencias disponibles: (hasta el momento *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, y *L. tarentolae*).

Posteriormente se realizó una búsqueda especializada que encuentra las proteínas de una ruta metabólica específica (búsqueda por *go term*), de esta manera se completó la información de todas las proteínas pertenecientes a la ruta para todas las especies del género cuyas secuencias estén disponibles. El criterio de rechazo de las secuencias fue valores E mayores a 0.001, y con una cobertura menor al 50 %.

6.2. Búsqueda de dominios

Se realizó una búsqueda de los dominios presentes para cada secuencia de la ruta y proteínas relacionadas, utilizando la base de datos Pfam (42), la cual realiza búsquedas de patrones específicos en secuencias de aminoácidos mediante la aplicación de cadenas de markov. Posteriormente, las agrupaciones de dichos patrones se clasificaron de acuerdo a (43), una clasificación que permite asociar la presencia de diferentes dominios en la familia de proteínas (específicamente para las quinasas) con sus funciones específicas, pudiendo reconocer las asociaciones entre ellas.

Las demás secuencias se agruparon con el mismo principio, si compartían un dominio funcional importante como el catalítico, entonces se posicionaban en el mismo grupo. De esta manera, con esta información se organizó la información disponible para los siguientes análisis, depurando las secuencias, es decir, incluyendo sólo las proteínas funcionales desde el punto de vista de sus dominios, y descartando las proteínas no funcionales o pseudogenes. Con esta información entonces, se construyó un modelo

cualitativo de la ruta del fosfatidilinositol, mostrando cada una de las proteínas encontradas en cada especie de *Leishmania* spp.

6.3. Alineamiento y análisis filogenético

En el programa MEGA 5 (44) se alinearon las secuencias para cada gen, con el algoritmo de alineamiento múltiple de Muscle (45), y con la ayuda del programa Mesquite se obtuvieron los alineamientos en formato Nexus para realizar las filogenias en el programa Mr Bayes (46), en la plataforma CIPRES. Se utilizaron como parámetros para la construcción de los árboles, 10 millones de generaciones, 4 cadenas para el análisis y un modelo mixto que es más específico y captura mejor la evolución de las secuencias al nivel de proteínas. Para enraizar las filogenias se utilizó un outgroup, el cual corresponde a *Tripanosoma cruzi* y *Tripanosoma brucei*, un género de tripanosomatidos muy relacionado con el género *Leishmania* spp.

Los árboles obtenidos se editaron en el programa Fig Tree v1.3.1 y se analizaron las relaciones para cada gen entre las especies, con el fin de reconocer posibles patrones de similitud y apoyar los análisis de homología de estos genes con proteínas humanas. Además se asociaron los dominios de cada proteína con los clados obtenidos, mediante la adición de esquemas de éstos, los cuales fueron realizados con la herramienta MYDomains del programa PROSITE de la plataforma ExpASy (47).

6.4. Análisis de similitud con las proteínas en humanos

Para proponer los blancos más adecuados para algún medicamento, se cuantificó la similitud y la presencia o no de ortología de las secuencias de la ruta encontradas en *Leishmania* spp. contra las respectivas proteínas pertenecientes al humano. Para esto se realizó una búsqueda de proteínas ortólogas con la herramienta evolution de la base de datos TriTrypDB (versión 4.2) y la base de datos InParanoid 7 (48), para confirmar la existencia de proteínas ortólogas en humanos. Posteriormente se realizó un DELTA-BLAST para una secuencia representante de cada gen (Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) en la base de datos de proteínas humanas, comparando los parámetros del mismo, e identificando cuáles proteínas poseen una menor similitud e identidad.

6.5. Construcción del modelo matemático booleano de la ruta

A partir de los principios generales en la construcción de los modelos booleanos, se construyó el modelo de la ruta de señalización, conociendo las interacciones a partir de la literatura (32–34,49,50) y aplicando la información de las proteínas encontradas para *Leishmania* spp adaptándola de esta forma a las interacciones de dichas proteínas, que conllevan finalmente a la activación de diversos factores de transcripción, y procesos de proliferación, el crecimiento y supervivencia. Se obtuvo una matriz de dependencia entre las moléculas implicadas y de esta manera se visualizó la sensibilidad de la estabilidad de la ruta a las perturbaciones de una u otra proteína perteneciente a ésta.

Las interacciones representadas en el modelo consisten en hiperarcos conectados por intersecciones “Y”, u “O”, o interacciones sencillas de activación o inhibición. Los estímulos externos que activan a algunas quinasas y fosfatasa no se especificaron de forma precisa ya que la información de los mecanismos exactos que desencadenan estas cascadas en *Leishmania* aún no son claros, por ejemplo, se sabe que PI3K es activada en mamíferos por diversas señales que incluyen proteínas G, y sistemas de diversos factores de crecimiento, sin embargo en *Leishmania* la evidencia apunta inicialmente a la existencia de unas proteínas homólogas a las proteínas G (51), y por tanto a un sistema de transducción de señales transmembranal pero eso no descarta otro tipo de activación para PI3K.

El grupo estímulos externos, que representan el input de la red que se configuró (en estado activo o inactivo en cada uno de estos nodos), se muestra en cada uno de los escenarios analizados como lo muestran las figuras 22, 23 y 25. La respuesta de la red se midió respecto a la activación de las respuestas mediadas por los segundos mensajeros PI3P, PI3,4,5P3, PI4,5P2 y DG (transporte a través de membranas, activación de factores de transcripción, y la activación de la ruta del calcio hasta PKC, respectivamente) que constituyen en output de la red.

De esta manera, se realizaron variaciones en los inputs de la red para observar los efectos en el output con el modelo asincrónico, separando las fases temporales. Además se analizaron los efectos de inhibición de algunas de las proteínas de la ruta, y según su

severidad entonces se compararon los resultados de análisis anteriores para la búsqueda de un blanco contra medicamentos.

Es así como se construyó el modelo lógico con el software ProMoT v.8.5 (52), exportando la descripción gráfica y matemática del mismo al paquete de análisis de redes biológicas CellNetAnalyzer (CNA) (33), en el cual se obtuvieron la matriz de dependencia y el análisis booleano de la red y las variaciones propuestas.

6.6. Evaluación del efecto de un inhibidor sobre la ruta

Después de evaluar exploratoriamente la regulación de la ruta modelada desde el enfoque booleano, se simuló un efecto inhibitorio sobre algunas proteínas de la misma. Para esto, se calculó la matriz de dependencias en el programa CellNetAnalyzer, que relaciona cada especie del modelo con sus interacciones, de activación, desactivación o ambas; luego, con esta información se postularon las proteínas a las cuales se les aplicó un estado de apagado o desactivación en el modelo y se corrió en el mismo programa ya mencionado, teniendo en cuenta además los resultados obtenidos a partir de los análisis de homología con las proteínas de la ruta en humanos.

6.7. Construcción del modelo lógico dinámico

Partiendo del modelo booleano construido en CellNetAnalyzer se utilizó el software Odefy, integrado al primero, para transformarlo en un sistema dinámico. Se modeló la red, utilizando la aproximación Hillcube, y dejando los parámetros K y t constantes para todos los nodos con sus valores por default, que son recomendados en el caso de no poseer información adicional. Se tomaron 10 unidades temporales, luego se tomó la gráfica de la dinámica de la red y se comparó con los resultados obtenidos con la red booleana original, teniendo en cuenta la importancia de la construcción y estandarización de este modelo como perspectiva.

7. RESULTADOS

7.1. Proteínas encontradas y modelos asignados

En la tabla 1 se muestran cada una de las proteínas quinasas y fosfatasa pertenecientes a la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp, su nombre completo y abreviado y su clasificación EC. Algunas de las proteínas encontradas no tienen clasificación EC, y no se encuentran en la ruta reportada por el KEGG, pero en la base de datos TriTrypDB sí lo están, además identificadas, por ello se mantuvieron en los análisis posteriores. En la tabla 2 se muestran los números de acceso de las secuencias encontradas para cada gen perteneciente a la ruta para cada especie.

Tabla 1. Lista de las proteínas encontradas para la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp con su nombre abreviado y clasificación EC

Enzima	Nombre completo	Clasificación EC
PI4K	Fosfatidilinositol 4 quinasa	[EC:2.7.1.67]
PI(4)P5K	1-Fosfatidilinositol 4 fosfato 5 quinasa	[EC:2.7.1.68]
PI3K tipo (1A, 1B, 2, 3)	Fosfatidilinositol 3 quinasa	[EC:2.7.1.137]
PTEN (IP3 phos)	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato 3 fosfatasa	[EC:3.1.3.67] [EC:3.1.3.16] [EC: 3.1.3.48]
Myo I mono phos	myo-inositol-1(o 4)-monofosfatasa	[EC:3.1.3.25]
DAK	diacylglycerol quinasa	[EC:2.7.1.107]
IP3 5 phos (1 y 2)	Inositol 1,4,5 trifosfato 5 fosfatasa	[EC:3.1.3.56]
PI 4,5 BP 3K (PI3K 2)	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato 3 quinasa	[EC:2.7.1.153]
IPOI 1P phos	Inositol polifosfato 1 fosfatasa	[EC:3.1.3.57]
PI(3,5)K	Fosfatidilinositol 3,5 quinasa	[EC:2.7.1.150]
IPoIP K/IP3 3K	Inositol polifosfato quinasa	
PIK	Fosfatidilinositol quinasa	
Ipol P Phos(IP5 phos)	Inositol polifosfato 5 fosfatasa	[EC:3.1.3.36]
PLC	Fosfatidilinositol fosfolipasa C	[EC:3.1.4.11]
CDIPT (CDP-DGI)	CDP-diacilglycerol--inositol 3-fosfatidiltransferasa	[EC:2.7.8.11]
CDP-DG	phosphatidate cytidyltransferase	[EC:2.7.7.41]
Calmodulina		
PKC		
IP3R		

Posteriormente, a partir de información recolectada en las bases de datos, y que se muestra en la tabla 2, fue posible identificar cada una de las copias de cada gen que codifican para las proteínas de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp. De esta manera, se encontró que hay proteínas con varias proteínas codificadas por una serie de genes parálogos dentro de una misma especie, correspondientes a los genes: PI4K, PI(4)P5K, PI3K tipo (1A, 1B, 2, 3), Myo I mono phos, DAK, IP3 5 phos, PLC, y CDP-DG. Dentro de cada copia se encontró una conservación en la posición del gen en el cromosoma, es decir, sintenia. Otros genes tuvieron copias únicas (IP3 5 phos, PTEN, PIK3 2, IPOL 1P PHOS, PI(3)P5K, IPoIP K/IP3, PIK, IPoIP phos, CDIPT, PTEN, calmodulina, PKC e IP3R).

En la búsqueda de modelos y dominios, que se encuentran relacionados en la tabla A1 (del anexo) se encontraron basados en la clasificación de para las PIKs de (43) los modelos 1 al 5; los modelos 6-10 fueron adicionados para las proteínas fosfatasas y las quinasas que no contenían el dominio PIK (dominio catalítico clave en la familia de las fosfatidilinositol quinasas); luego del 11 al 17 se relacionaron las demás proteínas, a las cuales se les asignó un modelo a cada una.

Los modelos 1 a 4 que incluyen a las PIKs convencionales, contienen: el modelo 1 a las PI3K clase III, éste posee en la zona N-terminal el dominio C2 que está asociado con la unión a membrana uniéndose selectivamente a lípidos como fosfatidilserina y fosfatidilcolina (2), un dominio kA sin función conocida pero que se ha sugerido está involucrado con la unión al sustrato, y un dominio catalítico de unión a ATP PIK. Las proteínas clasificadas bajo este modelo corresponden a una PI3K tipo (1A, 1B, 2, 3), presente en todas las especies de *Leishmania* en el cromosoma 24.

El modelo 2 representa a las PIK3 clase I, el cual posee además de los dominios del modelo 1, un dominio llamado RBD que es similar al dominio de unión a la proteína ras. A esta clase de proteínas se le han atribuido funciones intracelulares. El producto de ésta es PI(3,4,5)P3, un conocido segundo mensajero que se une a proteínas como PKB y Akt (6). El gen asociado a este modelo es el PI3K tipo (1A, 1B), un gen de copia única ubicado en el cromosoma 14, que en *L. major* se encuentra sin el dominio C2 y en *L. brasiliensis* tiene parcialmente el dominio kA y PIK.

Tabla 2. Lista de las proteínas encontradas para cada especie de *Leishmania* con su ubicación cromosómica

Especie	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. tarentolae</i>	<i>L. donovani</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>
Gen								
PI4K	LmjF29.1450, LmjF34.3590	LinJ29.1550, LinJ34.3370	LbrM20.V2.3170, LbrM29.V2.1540	LmxM0829.1450, Lmx33.3590	LtaP29.1600, LtaP34.3510	LdBPK 343370.1, LdBPK 291550.1	Tb927.3.4020, Tb927.4.1140	
PI(4)P5K	LmjF34.3090, LmjF35.9560, LmjF36.0370, LmjF31.2710	LinJ34.4320, LinJ35.0560, LinJ36.0400, LinJ31.2790	LbrM20.V2.2670, LbrM35.0460, LbrM31.3050	LmxM36.0370, LmxM33.3090, LmxM34.0560, LmxM30.2710	LtaP34.3000, LtaP35.0690, LtaP36.0360, LtaP31.3140	LdBPK 312790.1, LdBPK 360400.1, LdBPK 350560.1, LdBPK 044320.1	Tb927.4.1620, Tb927.10.4770	Tc00.1047053504057.104 , Tc00.1047053511001.70, Tc00.1047053508065.50
PI3K tipo (1A, 1B, 2, 3)	LmjF20.1120, LmjF24.2010, LmjF30.1850, LmjF.32.1460	LinJ20.1140, LinJ24.2090, LinJ30,1840, LinJ.32.1520	LbrM17.V2.0840, LbrM24.V2.2090, LbrM20.5280, LbrM.32.1620	LmxM24.2010, LmxM20.1120, LmxM29.1850, LmxM33.3940, LmxM.31.1460	LtaP30,1870, LtaP24.2190, LtaP32.1550	LdBPK 343750.1, LdBPK 201140.1, LdBPK 301840.1, LdBPK_242090.1 , LDBPK_321520	Tb11.01.6980, Tb927.8.6210, Tb927.1.1930, Tb11.01.6300	TcL3000.11.15490, Tc00.1047053511067.4, Tc00.1047053508997.20
IP3 5 (2) phos	LmjF11.1010	LinJ11.1010	LbrM11.0810	LmxM11.1010	LtaP11.0980	LdBPK 111010.1	Tb11.02.4140	Tc00.1047053510101.130
myo I mono phos	LmjF17.1390, LmjF15.0880	LinJ17.1510, LinJ15.0940	LbrM17.V2.1530, LbrM15.0910	LmxM15.0880, LmxM17.1390	LtaP17.1530, LtaP15.0890	LdBPK 171510.1, LdBPK 150940.1	Tb09.160.4620, Tb927.5.2690	Tc00.1047053506579.30, Tc00.1047053507047.120
DAK	LmjF35.5370, LmjF16.1290	LinJ35.5060, LinJ16.1340	LbrM34.V2.5310, LbrM16,1340	LmxM34.5370, LmxM16.1290	LtaP34.0020, LtaP16.1280	LdBPK 355060.1	Tb927.8.5140	Tc00.1047053511217.30
IP3 5 phos	LmjF15.1210, LmjF34.1220	LinJ15.1210, LinJ34.1320	LbrM15.V2.1160	LmxM15.1210, LmxM33.1220	LtaP15.1140	LdBPK 151210.1	Tb09.160.4180	Tc00.1047053505977.40
PI3K tipo (1A, 1B)	LmjF14.0020	LinJ14.0020	LbrM14.0020	LmxM14.0020		LdBPK 140020.1	Tb927_04_v4	Tc00.1047053510167.10
IPO1 PHOS	LmjF31.2920	LinJ31.3030	LbrM31.V2.3290	LmxM30.2920	LtaP31.3410	LdBPK 313030	Tb927.8.7170	Tc00.1047053507897.4

PI(3)P5K	LmjF27.0890	LinJ27.0750	LbrM27.0970	LmxM27.0890	LtaP27.0910	LdBPK 270750.1	Tb11.47.0002	Tc00.1047053503793.20, Tc00.1047053506719.10
IPoIP K/IP3 3K	LmjF14.0340	LinJ14.0340	LbrM14.0340	LmxM14.0340	LtaP14.0320	LdBPK 140340.1	Tb927.7.4400	Tc00.1047053504213.90
PIK	LmjF02.0120	LinJ02.0100	LbrM02.0130	LmxM02.0120	LtaP02.0090	LdBPK 020100.1	Tb927.2.2260	Tc00.1047053506533.34
IPoIP Phos (IP5 Phos)	LmjF24.0820	LinJ24.0840	LbrM24.0840	LmxM24.0820	LtaP24.0900	LdBPK 240840.1	Tb11.02.3170	Tc00.1047053508647.230
PLC	LmjF.22.1680, LmjF.30.2950, LmjF.35.0040	LinJ.22.1530, LinJ.30.2970, LinJ.35.0040	LbrM.22.1590, LbrM.34.0080	LmxM.22.1680, LmxM.29.2950, LmxM.34.0040	LtaP22.1650, LtaP35.0150	LdBPK 350040, LdBPK 302970	Tb11.02.3780	Tc00.1047053504149.160
CDIPT	LmjF.26.2480	LinJ.26.2500	LbrM.26.2410	LmxM.26.2480	LtaP26.2630	LdBPK 262500	Tb09.160.0530	Tc00.1047053510349.50
PTEN	LmjF.34.1430	LinJ.34.1530	LbrM.14.1280	LmxM.33.1430	LtaP34.1660	LdBPK 341530	Tb11.01.5450	Tc00.1047053506637.100
calmodulina	LmjF.09.0930	LinJ.09.0970	LbrM.09.0970	LmxM.09.0930	LtaP09.0940	LdBPK 090970	Tb11.01.4622	Tc00.1047053507483.39
CDP-DG	LmjF.26.1620, LmjF.32.2870	LinJ.26.1600, LinJ.32.3010	LbrM.26.1640, LbrM.32.3110	LmxM.26.1620, LmxM.31.2870	LtaP26.1650, LtaP32.3050	LdBPK 261600, LdBPK 323010	Tb927.7.220	Tc00.1047053511237.40, Tc00.1047053509073.70
PKC	LmjF.26.1000	LinJ.26.0970	LbrM.26.1010	LmxM.26.1000	LtaP26.0920	LdBPK 260970	Tb927.7.940	Tc00.1047053508215.9
IP3R	LmjF.16.0280	LinJ.16.0290		LmxM.16.0280	LtaP16.0280	LdBPK 160290		

Los modelos 3 y 4 representan la familia el PI4K. El Modelo 3 posee únicamente el dominio PIK, y es el ortólogo de PIK1 en levadura; el modelo 4 posee además el dominio kA y es el ortólogo de Stt4 en la misma. En ésta, cumplen funciones en la morfología celular, de vacuolas y golgi, además de funciones secretoras. Los homólogos en vertebrados están involucrados en el correcto funcionamiento de Golgi. El producto de estas proteínas PI(4)P es requerido para la viabilidad celular, activando la ruta Rho1/Pkc1 a través de MAP quinasas. La proteína Stt4 en levaduras además por su posición en la membrana puede regular la vía PKC y la organización del citoesqueleto (6), (2).

En el caso del modelo 3 se clasificó una proteína correspondiente al gen PIK4 del cromosoma 34 en las especies de *Leishmania* a excepción de *L. brasiliensis* que lo tiene en el cromosoma 20 y de *L. mexicana* en el cromosoma 33. También se clasificó en este grupo una PI3K tipo (1A, 1B, 2, 3) ubicada en el cromosoma 30 con las mismas excepciones que la anterior pero en los cromosomas 17 y 29 respectivamente. Cuando se clasificaron las proteínas en el modelo 4 se ajustó un gen PI4K ubicado en el cromosoma 29 en las especies de *Leishmania*.

El modelo 5 contiene al grupo de proteínas PIK relacionadas. Las cuales se caracterizan por tener dominios relacionados conservados. Éstas poseen un grupo de dominios FAT y FATC que son comunes para todas ellas. Proteínas como ATM, Atr y DNA PKC pertenecen a este grupo y son activadas ante daños en el DNA, por los check-points del ciclo celular (2). Los miembros de la familia relacionada con PIK también incluyen proteínas que regulan el crecimiento celular (TOR) y la estructura de la cromatina (TRRAP), sin embargo, el mecanismo de acción de TRRAP sigue sin estar claro, ya que su dominio PIK carece de los aminoácidos conservados necesarios para la unión a ATP y la actividad catalítica (53). Este modelo se ajustó a las proteínas correspondientes a los genes PI3K (1A, 1B, 2, 3) con dos grupos de secuencias: una del cromosoma 20 y otra del 32, y del gen PIK con secuencias situadas en el cromosoma 2.

En el modelo 6 se tiene un dominio relacionado con la enzima fosfatidilinositol 4 fosfato 5 quinasa, que cataliza una reacción que produce PI(4,5) BP, el cual puede ser catalizado por PLC y que genera DAG y IP3, importantes segundos mensajeros en la ruta de liberación de Calcio y unión a múltiples factores de transcripción (27); además este producto puede ser tomado por PIK 3 produciendo PI(3,4,5)triP activando varios factores

de crecimiento. Esta enzima se ha encontrado que también juega un papel importante en el proceso de exocitosis (27), (28). Dentro de los genes asociados a este dominio se encontraron todos los PI(4)P5K y PI(3)P5K que además tuvieron algunos dominios accesorios como FYVE que tiene funciones en la organización de las proteínas vacuolares (54).

El modelo 7 incluye un dominio endonucleasa/exonucleasa/fosfatasa llamado PHOS, que agrupa a los genes IP3(5) phos e IP3(5) 2 phos. Por otro lado el modelo 8 incluye una familia de proteínas con un dominio Myo I mono fosfatasa: que son los Myo I mono phos y IPOL 1P PHOS.

El modelo 9 incluye a la diacilglicerol quinasa (un dominio catalítico y otro accesorio), que transforma al DAG en PA (ácido fosfatídico) utilizando ATP como fuente de fosfato. En organismos multicelulares PA está ligado con funciones como el crecimiento celular, el transporte en membranas, diferenciación y migración, además de que la enzima genera un puente entre la síntesis de lípidos y señalización (55).

Los modelos siguientes están describiendo cada uno a un gen diferente, por ejemplo el número 10 corresponde a las inositol polifosfato quinasa, con un dominio llamado IPK que en *S. cerevisiae* está asociado con la resistencia a las altas concentraciones de sal, la integridad de la pared celular y la morfogénesis vacuolar (56). El modelo 11 se refiere al gen de la fosfoinositol lipasa C una importante proteína implicada en la formación del 4,5-bifosfato fosfatidilinositol (PIP2) (importante mensajero en las vías de señalización en una forma dependiente de calcio) modulando respuestas celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la remodelación del citoesqueleto, el tráfico vesicular, la conductancia del canal de iones, la función endocrina y la neurotransmisión.

El modelo 12 y 13 están implicados en la biosíntesis del fosfatidilinositol, transformando el fosfatidato en fosfatidil D-1-myo-inositol, un compuesto que puede entrar en la cascada de fosforilación nuevamente. La enzima CDIPT (CDP-diacilglicerol--inositol 3-fosfatidiltransferasa) posee un dominio llamado CDP-OH P transferasa encargado de transferir el grupo CDP al fosfato del fosfatidato, y la CDP-DG I transferasa o PI sintasa termina la reacción de renovación del fosfatidilinositol.

El modelo 14 incluye a la proteína PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa) que actúa como fosfatasa en varios pasos diferentes en la ruta (ver figura 2). Esta proteína posee dos dominios encontrados en la búsqueda de pfam: DSPc y PTEN C2, que son un dominio catalítico y otro de unión a membranas respectivamente.

Los últimos 3 modelos están relacionados con la activación de la ruta de señalización del calcio: la calmodulina con sus dominios EF hand de unión a Ca^{+2} , la protein quinasa C PKC con los dominios PRKCSH y PRKCSH 1 que requiere calcio para su activación y IP3R que es activado por unos de los intermediarios de la ruta para servir como canal del calcio en su liberación, y posterior cascada de señalización.

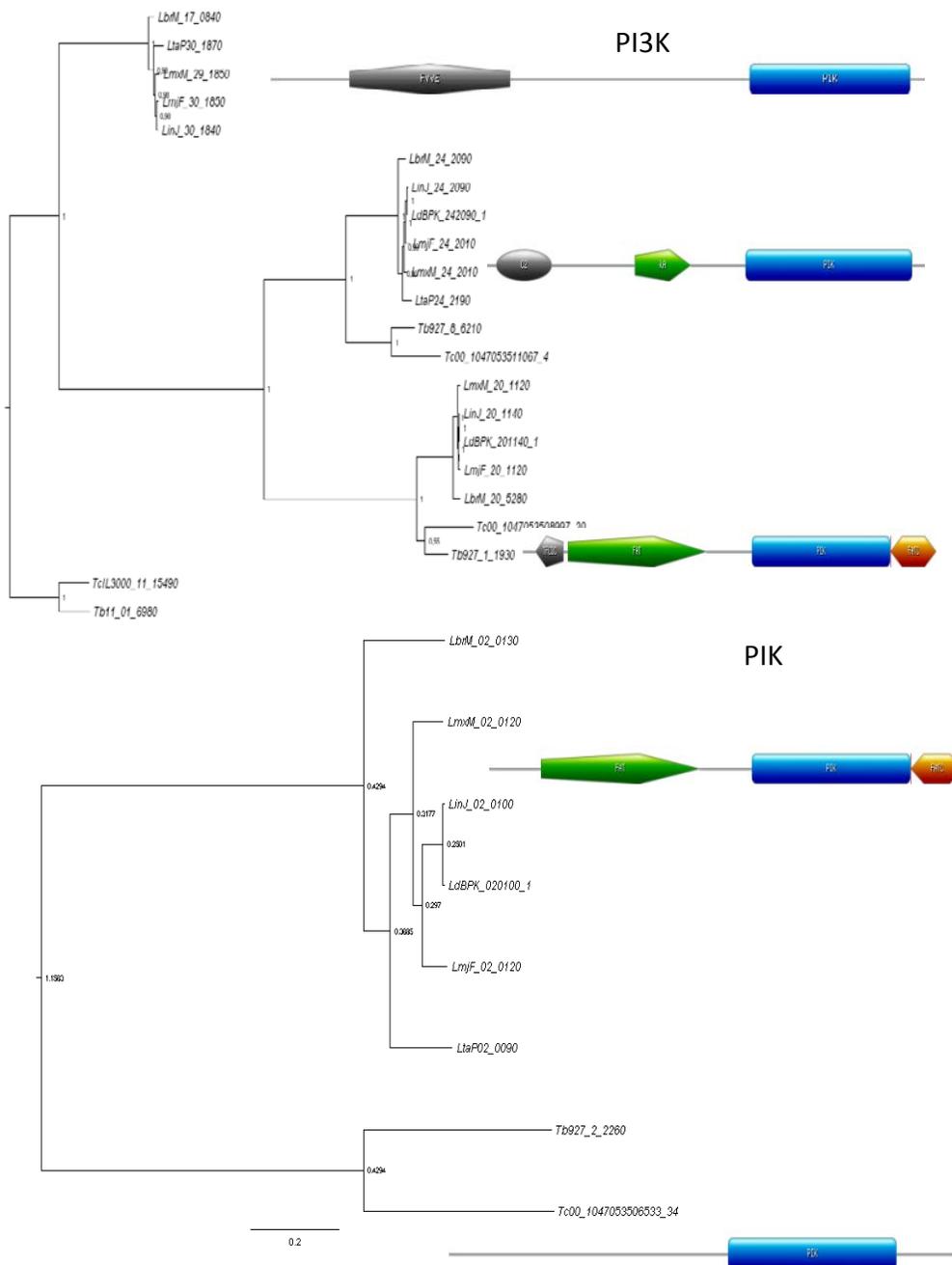
7.2. Análisis filogenético

En la figura 3 se muestran algunas de las reconstrucciones de las relaciones filogenéticas por el método probabilístico bayesiano para cada gen encontrado para la ruta, substrayendo las secuencias cuyos dominios no se hubieran encontrado o estuvieran incompletos (las demás filogenias se encuentran en la figura A1 del anexo).

Se encontró que la sintenia de estos genes es significativa, haciendo que se agruparan las copias de un gen que poseen una misma posición cromosómica: PI4K, PI(4)P5K, PI3K tipo (1A, 1B, 2, 3), Myo I mono phos, DAK, IP3 5 phos, PLC, y CDP-DG (éstos son los genes que se encontraron con más de una copia por especie). Además, en la mayoría de los árboles construidos se encontraron las siguientes relaciones: el grupo más inclusivo está formado por las especies *L infantum* y *L donovani*, luego viene *L major*, seguido de *L mexicana*, *L tarentolae* y finalmente el más externo, *L braziliensis*; aunque en algunos casos, el valor de las probabilidades posteriores no logra soportar esta clasificación, presentando inclusive algunas politomías, como es el caso de IP3(5) phos, CDIPT y PKC, que se deben a la poca variación que presentan algunas secuencias, es decir, que están tan conservadas que no se logran diferenciar ni agrupar, llegando inclusive a ser completamente idénticas como sucedió con la secuencia aminoacídica de la calmodulina.

Además de presentar las filogenias, también se adjuntaron a las figuras esquemas con los dominios proteicos para cada gen (con cada dominio correspondiente encontrado), mostrando una correspondencia con los clados, es decir, que hubo una concordancia

entre los clados obtenidos con los dominios que de dichas secuencias. En algunos genes (con o sin varias copias dentro de cada especie) se observaron diferencias entre los dominios, por ejemplo IPOL 1P PHOS y Myo Mono I phos, poseen secuencias con una o dos copias de su dominio característico, PI(4)5K, que posee un clado con unos dominios diferentes (kinesina y MORN) a las que se encuentran en las demás secuencias (PIP5K); otras proteínas poseen secuencias que además de su dominio principal presentan un dominio accesorio, como es el caso del gen PIK que tiene el dominio PIK y algunas secuencias poseen además los dominios FATC y FAT, o el caso del gen PI4K que uno de sus clados posee el dominio PIK y otro además posee el dominio KA.



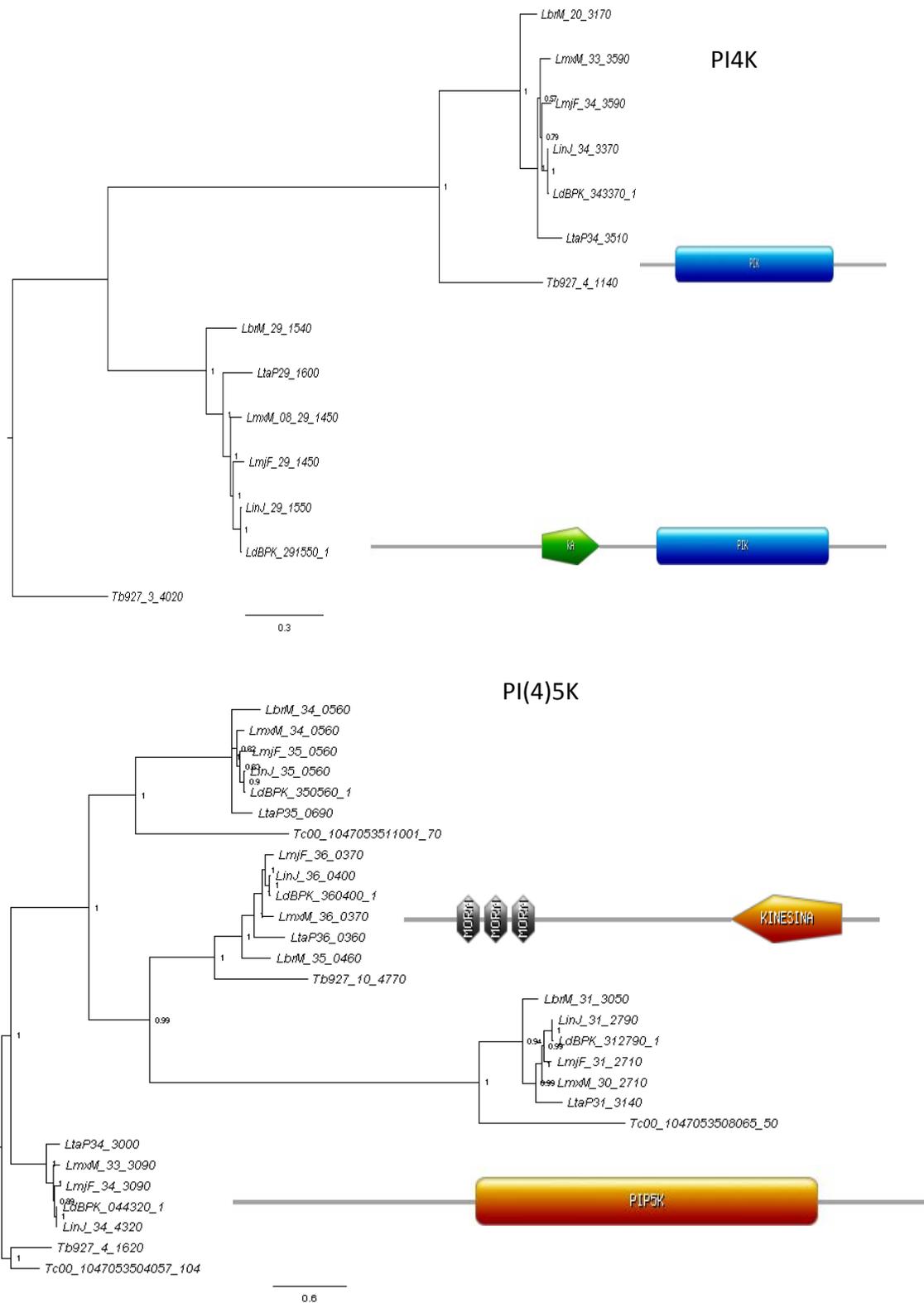


Figura 3. Filogenias obtenidas para los genes PI3K, PI4K, PIK y PI(4)5K, asociadas con los modelos de dominios para los clados

7.3. Análisis de ortología y similitud con las proteínas de la ruta del fosfatidilinositol en humanos

A partir de los genes encontrados para la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania* spp se realizó una búsqueda de ortólogos con las herramientas “Evolution” de la base de datos TriTrypDB y con la base de datos InParanoid7, cuyos resultados se muestran en la tabla 3. Para todas las secuencias se encontró por lo menos un representante de las secuencias como ortólogo, excepto para los genes IPOL 1P PHOS y PI(3)P5K. Lo anterior no significa que estas proteínas no existan en el humano, simplemente que las que están encargadas de esta función en *H. sapiens* no tienen un origen común con las encargadas en *Leishmania* spp, teniendo en cuenta que estas búsquedas implican resultados por homología desde un perfil filogenético que no descartan una homología funcional, como se comprobó al examinar el mapa de la ruta en el KEGG y al realizar el Delta-blast de dichos genes.

Tabla 3. Lista de proteínas encontradas con ortólogos en humanos (en el caso de *L. donovani* no se encontró en la base de datos por ello ninguna secuencia pudo analizarse para ortología en Tryprip ni en InParanoid)

Especie	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. tarentolae</i>
gen					
PI4K	LmjF29.1450 LmjF34.3590	LinJ29.1550 LinJ34.3370	LbrM20.V2.3170 LbrM29.V2.1540	LmxM0829.1450 Lmx33.3590	LtaP29.1600 LtaP34.3510
PI(4)P5K	LmjF34.3090 LmjF35.9560	LinJ34.4320 LinJ35.0560	LbrM20.V2.2670 LbrM35.0460	LmxM33.3090 LmxM34.0560	LtaP34.3000 LtaP35.0690
PI3K tipo (1A 1B 2 3)	LmjF24.2010 LmjF.32.1460	LinJ24.2090 LinJ.32.1520	LbrM24.V2.2090 LbrM20.5280 LbrM.32.1620	LmxM24.2010 LmxM.31.1460	LtaP24.2190 LtaP32.1550
IP3 5 (2) phos	LmjF11.1010	LinJ11.1010	LbrM11.0810	LmxM11.1010	LtaP11.0980
myo I mono phos	LmjF17.1390	LinJ17.1510	LbrM17.V2.1530	LmxM17.1390	LtaP17.1530
DAK	LmjF35.5370	LinJ35.5060	LbrM34.V2.5310	LmxM34.5370	LtaP34.0020
IP3 5 phos	LmjF15.1210 LmjF34.1220	LinJ15.1210 LinJ34.1320	LbrM15.V2.1160	LmxM15.1210 LmxM33.1220	LtaP15.1140
PI3K tipo (1A 1B)	LmjF14.0020	LinJ14.0020	LbrM14.0020	LmxM14.0020	
IPoIP K/IP3 3K	LmjF14.0340	LinJ14.0340	LbrM14.0340	LmxM14.0340	LtaP14.0320
PIK	LmjF02.0120	LinJ02.0100	LbrM02.0130	LmxM02.0120	LtaP02.0090
IPoIP Phos (IP5 Phos)	LmjF24.0820	LinJ24.0840	LbrM24.0840	LmxM24.0820	LtaP24.0900
PLC	LmjF.22.1680 LmjF.30.2950	LinJ.22.1530 LinJ.30.2970	LbrM.22.1590	LmxM.22.1680 LmxM.29.2950	LtaP22.1650
CDIPT	LmjF.26.2480	LinJ.26.2500	LbrM.26.2410	LmxM.26.2480	LtaP26.2630

PTEN	LmjF.34.1430	LinJ.34.1530	LbrM.14.1280	LmxM.33.1430	LtaP34.1660
calmodulina	LmjF.09.0930	LinJ.09.0970	LbrM.09.0970	LmxM.09.0930	LtaP09.0940
CDP-DG	LmjF.26.1620	LinJ.26.1600	LbrM.26.1640	LmxM.26.1620	LtaP26.1650
PKC	LmjF.26.1000	LinJ.26.0970	LbrM.26.1010	LmxM.26.1000	LtaP26.0920
IP3R	LmjF.16.0280	LinJ.16.0290		LmxM.16.0280	LtaP16.0280

A partir de los resultados del Delta-blast corrido para un representante de cada grupo de secuencias para cada gen se construyeron tablas como se muestra en el anexo (tabla A2). Se muestran los primeros 10 resultados arrojados para cada búsqueda (en el material suplementario se presentan las tablas completas). A partir de éstos se encontraron proteínas con un alto porcentaje de identidad, un alto score y un bajo valor E, es decir, alineamientos con una alta homología, otros alineamientos presentaron un menor porcentaje de identidad y bajos valores E, hasta llegar a bajos porcentajes de identidad. Bajo esta clasificación se encuentra con la mayor homología la calmodulina con un porcentaje de identidad cercano al 90%; luego en otro grupo muy similar se agrupan proteínas como PI3K en su copia del cromosoma 24, CDIPT, CDP-DG, PI3K 2, PIK, PKC, PLC, con un porcentaje de identidad superior a 30. El siguiente grupo posee un valor del porcentaje de identidad entre 20 y 30 e incluye a PTEN, PI4K, PI3K del cromosoma 20, PI(4)P5K, PI(3)P5K, Myo mono I Phos, IPoIP phos, IPoIPK, IP3R, IP35 phos, y DAK. Finalmente el grupo con valores entre 10 y 20 incluye a los genes: IP3(5) phos, PI(4)P5K en su copia del cromosoma 31, PI3K de la copia del cromosoma 30 y IPOL 1P PHOS.

Según lo anterior las proteínas más diferentes de sus homólogos en humanos son las últimas enunciadas y representarían la primera opción a tener en cuenta para sugerir un blanco de medicamentos. Dentro de la familia de las proteínas con el dominio PIK se encontró que hay proteínas con mayor similitud a las proteínas en humanos como la copia del cromosoma 24 PIK3 con todas las subunidades de PIK3 en humanos, en el caso de PI4K se encontraron mayores diferencias, encontrando que las que mayor identidad tienen con sus homólogas en *Leishmania* son PI4K 2A y 2B en humanos. La proteína de este grupo que menos identidad posee es PIK y que se asocia con algunas proteínas sin nombre y algunas copias de PI3K. A partir de lo anterior se encontró que se favorece a esta proteína por encima de PI3K y PI4K como posible blanco.

Teniendo en cuenta los detalles de activación de la ruta o el input, además de los output incluidos en el modelo (mediado por los segundos mensajeros PI3P, PI3,4,5P3, PI4,5P2 y DG - transporte a través de membranas, activación de factores de transcripción, y la activación de la ruta del calcio hasta PKC, respectivamente-) entonces se procedió a modelar un primer escenario para la ruta, que se refiere a eventos tempranos o de activación de las quinasas, tal y como se muestra en la figura 5. Para lograr lo anterior se analizó el modelo asincrónico poniendo un tiempo de activación menor para las quinasas y uno mayor o tardío para las fosfatasa como PTEN, PLC e IPol P phos, en otras palabras, se analizó la ruta en un momento de inactivación de las fosfatasa de la red.

Después de la simulación como se observa en la figura 4, se encontró que este evento temprano permite la activación de los segundos mensajeros PI3P y PI3,4,5P3 pero no de PI4,5P2 ya que éste es consumido como sustrato por la enzima de PI3K, por lo que es necesario tener un mayor detalle sobre la cinética de estas proteínas para determinar cuál es la relación entre los niveles de activación de PI3K y la velocidad del consumo PI4,5P2, ya que desde el punto de vista cualitativo del modelo booleano la activación de PI3K excluye la formación de este producto.

Una situación similar se presenta con la activación de PI4P, el cual es consumido por la quinasa PI4,5PK, mostrando que para maximizar la activación de estos segundos mensajeros es necesario que ésta se realice en configuraciones temporales diferentes para la ruta, es decir, que sean unas proteínas específicas las que se activen y maximicen la formación de un determinado segundo mensajero, lo cual muestra además los puntos de regulación de la misma, que le permiten la optimización de la producción de un u otro segundo mensajero y por tanto de activación de procesos celulares diferentes.

Al analizar el modelo con los eventos tardíos (un segundo escenario), se observa que la activación de las fosfatasa direcciona la producción diferencial de segundos mensajeros; por ejemplo al activarse PTEN se reduce la producción de PI3P y PI3,4,5P3 y se potencia la producción de PI4,5P2 y de PI4P indirectamente. En el caso de PLC se muestra que es un punto de regulación muy importante dentro de la ruta ya que alimenta un bucle de retroalimentación para la biosíntesis del 1D-myo-inositol, que es un sustrato clave en la formación de los fosfatidilinositoles; además, la actividad de PLC activa la formación de diacilglicerol y la ruta de señalización mediada por calcio. Esta simulación tardía de la ruta se muestra en la figura 6 y muestra como la ruta recupera un estado basal de activación después de un estímulo.

7.5. Efecto de un inhibidor en la ruta del fosfatidilinositol

Después de observar el comportamiento de la ruta de manera general, se construyó la matriz de dependencia entre las especies que se muestra en la figura 7, entonces se encontraron interacciones de activación (que se representan con el color verde), de inhibición (en rojo), y con ambas funciones (en amarillo, que puede resultar de una interacción directa y otra indirecta por algún bucle de retroalimentación).

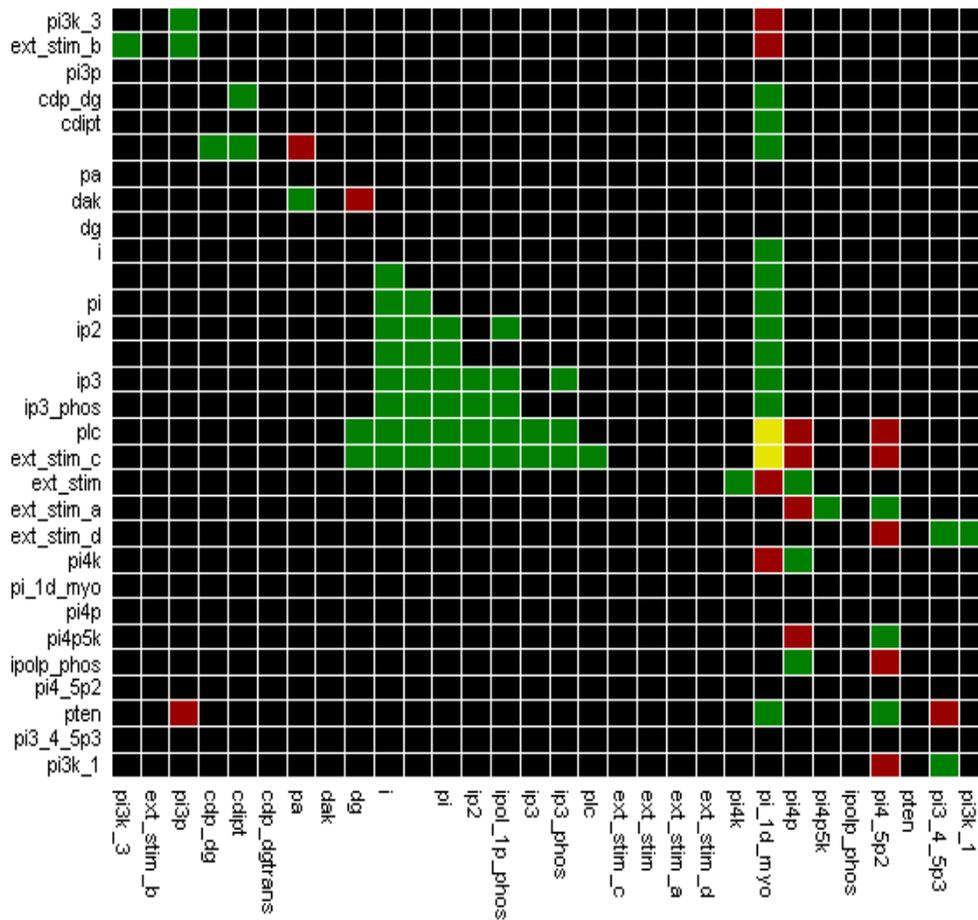


Figura 7. Matriz de dependencia entre las especies relacionadas en el modelo cualitativo. En verde se muestra la activación, en rojo la inhibición y en amarillo ambos.

de PI4K, ya que la reducción en el segundo mensajero PI4P evita la formación de PI4,5P2 y PI3,4,5P3 de una manera indirecta, al reducir el sustrato de las quinasas encargadas de producirlos; en el caso de la inhibición de una PI3K dependiendo de la subclase entonces si inhibirá PI3P o PI3,4,5P3 (en este caso además se afecta la regulación de la formación de PI4,5P2). Lo anterior sucede desde el punto de vista de activación de estas moléculas en el modelo, hablando de funcionalidad y sobrevivencia del parásito, seguramente cualquiera de las inhibiciones de estos importantes segundos mensajeros se traducirá en un daño irreparable de funciones celulares básicas como el transporte vesicular y activación de factores de transcripción, claro que esto debe comprobarse experimentalmente en el modelo biológico estudiado.

7.6. Modelo lógico dinámico de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania*

En las figuras 9 y 10 se muestra la simulación del modelo booleano en una escala temporal, que se obtuvo a partir del programa Odefy. En la figura 9 se esquematiza en el eje de las ordenadas la concentración normalizada de cada uno de los nodos de la red, y en eje de las abscisas una escala temporal discreta que denota las iteraciones del modelo inicial. Se muestra un gráfico de apoyo en la figura 10, que tiene en el eje de las ordenadas cada una de las especies y en el eje de las abscisas la escala temporal, para mostrar detalladamente cada especie, ya que algunas de ellas no se aprecian porque tienen un perfil idéntico.

Este ejemplo de simulación de la ruta, que se realizó con los mismos inputs del modelo tardío, y aunque se hayan ajustado los parámetros por defecto, muestra el tipo de información que se puede obtener de esta simulación. Inicialmente, se observa que los perfiles de concentración presentan un incremento que es secuencial por grupos de las especies, según la cercanía a los inputs y si ocupan el lugar de sustrato o de producto: el primer perfil corresponde a la especie PA, que se relaciona con la activación de la proteína DAK que es uno de los inputs del modelo; luego en la escala temporal, viene un perfil que es compartido por las moléculas PI3K1, PLC, PI(4,5)PK, PI4K y PI3K3, y CDP-DG todas ellas activadas por los estímulos externos relacionados en la simulación; el siguiente grupo incluye a PI4P es un producto de las anteriores; posteriormente, se encontraron los perfiles de las especies relacionadas con los efectos en cascada de la

fosfatasa PLC y CDP-DG ya activadas en los pasos anteriores: en su orden IP2, PI, luego DG, CDIPT, seguidos del perfil de IP3, y de IPoIP 1Phos, Myo 1D Mono Phos, terminando con IP3 Phos, I, lo cual se puede explicar ya que su carácter de sustrato hace que se acumule más lentamente. Luego vienen los perfiles asociados con PI3,4,5P3, PI3P, todas moléculas que poseen una activación y una inhibición (es decir que sirven como sustratos y como productos de algunas proteínas de la ruta) y por tanto el incremento en su concentración dependerá de los parámetros que definen estas interacciones. También se presentaron dos perfiles inusuales que corresponden a PI1D-Myo, y PI(4,5)P2 que son regulados regulado por 6 y 5 proteínas 3 de las cuales los usan como sustrato, y por tanto su producción es altamente afectada por la activación de éstas, mostrando un comportamiento bimodal.

El modelo muestra además como las interacciones entre los nodos generan un patrón temporal más complejo que al compararlo con el análisis booleano original, es posible relacionar a las moléculas más sensibles a la regulación del sistema con los patrones de concentración más lentos o con un comportamiento diferente al que presentan las demás especies, como ya se explicó.

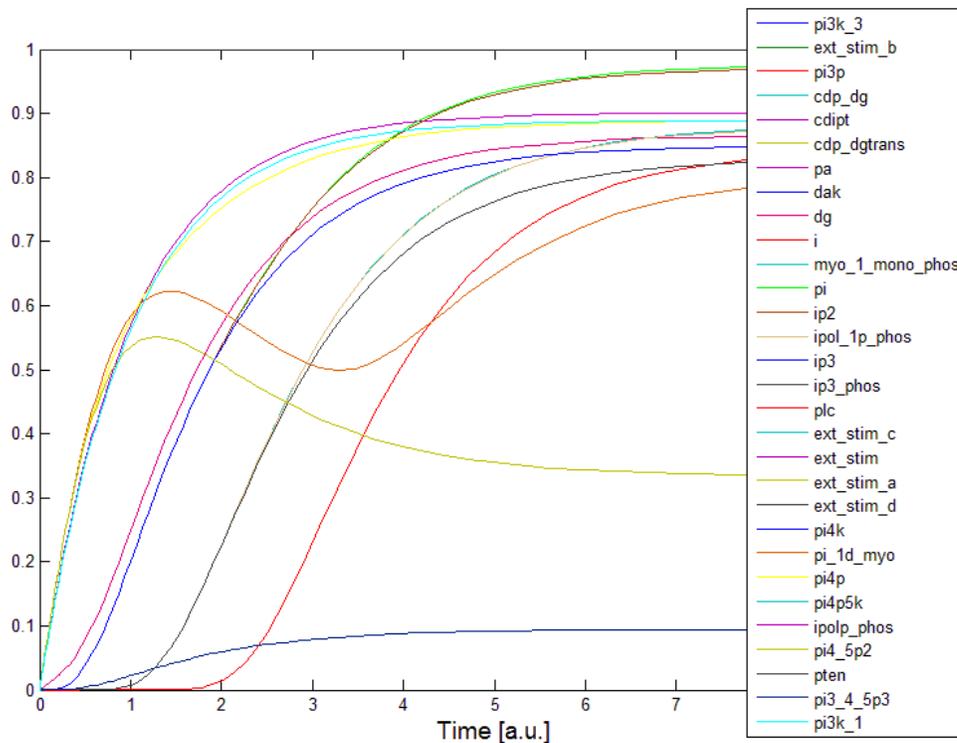


Figura 9. Simulación del modelo lógico dinámico de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania*

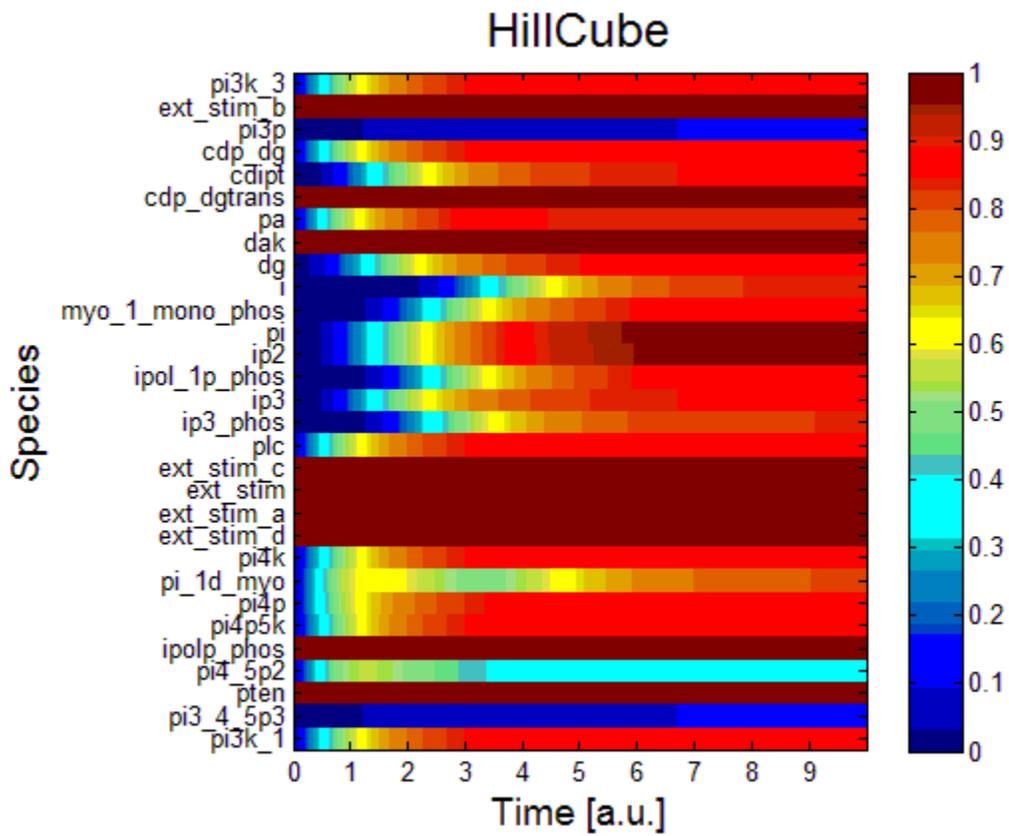


Figura 10. Simulación del modelo lógico dinámico de la ruta del fosfatidilinositol en *Leishmania*

8. DISCUSIÓN

La ruta de señalización del fosfatidilinositol es una ruta fundamental para múltiples procesos celulares en eucariotas, como la diferenciación, la supervivencia, el transporte intracelular, la activación de factores de transcripción, y muchos otros, haciéndola una vía que es clave para el diseño de medicamentos contra muchas enfermedades, desde bloquear a un parásito como en este caso, hasta el diseño de tratamientos para enfermedades complejas como el cáncer.

Hay evidencia suficiente para proponer a las proteínas de la ruta de señalización del fosfatidilinositol como nuevos blancos terapéuticos y para vacunas en la leishmaniasis: en primer lugar el hecho de que procesos tan fundamentales en *Leishmania* como la transducción de señales y la invasión al huésped estén dirigidos por este grupo de proteínas, y en segundo lugar la existencia de medicamentos que actualmente son utilizados (wortmannin y la rapamicina) como bloqueadores de la vía y la vía del TOR en otros tripanosomátidos (10,60).

A su vez, la comprobación práctica del éxito del diseño de medicamentos en este grupo de proteínas muestra que a partir de esos sitios conservados, por ejemplo pertenecientes al dominio catalítico (que es fundamental para la función de la proteína) como en el caso del wortmannin, es posible entonces proponer nuevas regiones que sirvan como blanco, y que a su vez puedan reducir los efectos secundarios al diferir de las proteínas humanas.

Dentro de los modelos encontrados en estas proteínas, los más estudiados para este grupo hasta el momento son el modelo 1 y el modelo 5. El modelo 1 tiene un papel esencial en el transporte a través de membrana, estudios realizados en el homólogo en levadura sugieren que este tipo de proteínas (PIK3 clase III) están involucradas en el transporte de endosomas, la endocitosis, la acidificación de vesículas y la autofagia. Estudios realizados en epimastigotes de *T. cruzi* han demostrado que la sobreexpresión de estas quinasas producen cambios morfológicos y funcionales relacionados con el transporte en las membranas, concluyendo que tiene un papel en la osmorregulación (6).

El otro modelo estudiado en tripanosomátidos es el 5, del cual se conoce que regula el crecimiento celular, remodelamiento del citoesqueleto, y la citocinesis. Hay evidencia que muestra que dos proteínas TOR quinasas (que hacen parte del modelo 5 de PIK relacionadas) funcionalmente diferenciadas controlan el crecimiento de *T. brucei* (6). Para

los demás modelos ya se han presentado en la sección de resultados las funciones asociadas, evaluadas y/o presumidas en otros modelos como levadura y en mamíferos.

Este sistema de proteínas que constituyen la ruta se encontró que es robusto: la presencia de múltiples copias de muchas de las proteínas evaluadas pueden ser muestra de una especialización en las funciones, haciendo que cada proteína cumpla con unos roles establecidos, por otro lado indica que frente a una mutación en alguna de ellas o alteración, la vía no quede completamente bloqueada, lo cual se espera considerando la importancia que ésta posee en la supervivencia del parásito. A algunas de estas copias se les encontró un ortólogo en humanos, a otras no, esto conllevó a que presentaran un porcentaje de similitud diferente cuando se compararon con las proteínas funcionalmente homólogas en humanos, lo cual debe analizarse con cuidado al momento de postular alguna de estas proteínas como blanco de un medicamento.

Dentro de este grupo de proteínas funcionalmente homólogas, se destacan dentro de las quinasas, los genes PI4K, PI3K, PI(4,5)K, dos de las cuales comparten el dominio PIK (PI4K y PI3K), un dominio catalítico que se encontró en los modelos del 1 al 5, lo que muestra su importancia en esta familia. También se encontró el dominio accesorio kA, presente en ambos genes pero no en todas sus copias; un dominio del cual todavía no se ha discernido su función pero se cree tiene que ver con la unión al sustrato lo cual le da un papel importante en la catálisis.

En el caso de las fosfatasas se destaca el dominio Mono I phos que se encuentra presente en las proteínas myo mono I phos y IPOL 1P phos, pero que no se encontró en IPOL P phos por lo que es necesario un estudio más detallado de esta proteína para determinar su mecanismo enzimático. Además a partir del estudio de ortología con proteínas humanas, esta proteína no presentó un homólogo, y bajos porcentajes e identidad en el Delta-Blast por lo que se presume que es una proteína disímil y con una evolución independiente en este linaje.

Desde el punto de vista filogenético las proteínas de la ruta de señalización del fosfatidilinositol mantuvieron la sintenia, es decir, se agruparon más estrechamente dentro de cada gen, dando indicio de que el origen de estas secuencias es único; además las relaciones de cercanía entre los genes en general fue constante, reflejando la clasificación de las especies analizadas. También los dominios mantuvieron su correspondencia, por

ejemplo, para el caso de los genes que poseen varios modelos de clasificación de dominios (PI4K y PI3K), se agruparon en clados claramente diferenciados.

Para profundizar con el análisis de la ruta, se implementó un modelo booleano que permite una descripción lógica, que una vez estuvo puesta a punto, permitió simular diferentes escenarios y predecir la respuesta de la red en términos de activación o desactivación de los nodos correspondientes al output. Esta respuesta cualitativa, se calcula mediante la propagación de las señales de entrada a lo largo de las conexiones lógicas (hiperarcos), la cual depende de la funcionalidad de los bucles de retroalimentación positiva o negativa y de la temporalidad de los eventos. Como vemos, es importante conocer cuáles son los alcances de este tipo de modelo: se debe establecer los estímulos de entrada, y el estado de equilibrio lógico del sistema se obtendrá si existe una coherencia entre las interacciones, así que es posible que haya respuestas que no se definan por una inconsistencia; por lo tanto, la información a partir de la cual se construye el modelo, y la definición de los tipos de interacción y los hiperarcos permitirán obtener una respuesta lógica completa y única de todos los nodos para un arreglo determinado. Adicionalmente, la posibilidad de separar un evento temprano de uno tardío permite apreciar los efectos de la entrada de la red antes de la regulación negativa de la señal, y también el efecto de un inhibidor como se hizo para este caso, con la fosfatasa PTEN y con las quinasas PI3K y PI4K.

Es importante además en la modelación, el soporte de la información que sirve de base para su construcción (6,34,57–59). Por ejemplo, al comparar el modelo construido con el mapa original de la base de datos KEGG se puede observar la carencia de algunas proteínas como PI5K, PI3K tipo 1A y tipo 1A,1B, 2, PI(5)P4K, SHIP y otras fosfatasas. Es importante notar que estas proteínas no fueron incluidas ya que no fueron encontradas en las bases de datos para *Leishmania*, además en el caso de las quinasas, se confirmó este resultado con (6) donde ninguna de estas proteínas de la familia de las PIK fue encontrada para los tripanosomatidos, lo cual soporta su exclusión de la red de señalización.

Los resultados del modelo cualitativo demuestran la robustez de la ruta, al amortiguar perturbaciones en la misma, sobretodo en la regulación negativa, mediante el bucle de retroalimentación, se observó como la función de PLC podría sustituir a algunas de las fosfatasas responsables del catabolismo de los fosfatidilinositoles, desde el punto de vista

de la producción del diacilglicerol y el inositol como sustratos, para la formación del fosfatidil 1D-myoinositol (primera molécula que comienza a fosforilarse por PI4K y PI3K en la ruta de señalización). El modelo mostró además, cómo a partir de la activación de las fosfatasas como PLC y PTEN la ruta se autorregula y recupera un estado basal; esta autorregulación se ve afectada al inducir la inhibición de alguna de estas fosfatasas (o knock-out en este caso, ya que sólo se puede programar uno de dos estados de activación 0 ó 1), sin embargo, con la información obtenida con el análisis de similitud con las proteínas en humanos entonces es posible perfilar a PTEN como una mejor candidata para un blanco de medicamento.

Un proceso similar al anterior se realizó con las quinasas PI3K y PI4K, y se determinó que PI4K sería una mejor candidata. Todos estos resultados deben ser comprobados experimentalmente, comparados con el modelo cualitativo, para obtener la información necesaria para avanzar en la validación de un modelo dinámico cuantitativo, que tenga la capacidad de predecir desde el punto de vista cinético el comportamiento de la ruta, en una condición inicial y ante una perturbación.

Luego, al construir el modelo lógico dinámico se observó que los patrones de concentración de las especies presentan un orden que se asocia en primer lugar con la distancia a la que se encuentra la molécula de los inputs, y que se deben activar las proteínas que metabolizan una especie antes de observar un cambio de la concentración de la misma. También se pudo asociar la intensidad de la activación de las especies con el número y la naturaleza de las interacciones que poseen, lo que a su vez evidenció cuáles especies se encuentran altamente reguladas dentro de la red, coincidiendo con los resultados obtenidos con el modelo booleano. Este enfoque booleano es importante como perspectiva de este trabajo ya que al ajustar los parámetros de cada especie, con datos experimentales será posible evaluar más realísticamente el comportamiento de la ruta, lo cual podría modificar sustancialmente la acumulación de las especies: esto es posible afirmarlo a partir de los perfiles obtenidos para las moléculas altamente reguladas y con los hallazgos de (38) donde midieron la respuesta en activación de las proteínas ERK y AKT en la ruta de señalización ERB, al modificar el tiempo de decaimiento de las estas especies, indicando un cambio drástico en los patrones de concentración de los mismos.

El presente estudio propuso una integración de las metodologías disponibles para el análisis bioinformático de una ruta de señalización, y el uso de la información recolectada en la construcción de un modelo matemático. Este modelo puede predecir los comportamientos y variaciones de la ruta, con el fin de identificar un posible blanco de medicamentos y de evaluar su efecto *in silico*. De esta manera se abre el camino para la validación experimental del modelo por medio de estudios de cinética enzimática, de imagenología biológica, etc.

9. REFERENCIAS

1. Walker RG. Leishmania CRK3 : CYC6 cyclin-dependent kinase as a drug target. University of Glasgow; 2008.
2. Bahia D, Oliveira LM, Mortara RA, Ruiz JC. Phosphatidylinositol-and related-kinases: a genome-wide survey of classes and subtypes in the Schistosoma mansoni genome for designing subtype-specific inhibitors. Biochemical and biophysical research communications [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Mar 13 [cited 2012 Jan 13];380(3):525–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19250641>
3. El-sayed NM, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran A, et al. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. science. 2012;404(2005).
4. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite , Leishmania major. Most. 2012;436(2005).
5. Caroline Ash and Barbara Jasny. Trypanosomatids: Genomes and Biology. Science. 2005;309:339–40.
6. Bahia D, Oliveira LM, Lima FM, Oliveira P, Silveira JF Da, Mortara RA, et al. The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania major, Leishmania braziliensis and Leishmania infantum--new tools for designing specific inhibitors. Biochemical and biophysical research communications [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Dec 18 [cited 2011 Jun 26];390(3):963–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852933>
7. Zerhouni E. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. Science [Internet]. 2004 [cited 2012 Jan 13];1754:151–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/306/5703/1895.short>
8. Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? Nature reviews. Drug discovery [Internet]. 2002 Apr;1(4):309–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12120282>
9. Stephens L, Williams R, Hawkins P. Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer. Current Opinion in Pharmacology. 2005;
10. Braga M V, de Souza W. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of Trypanosoma cruzi. FEMS microbiology letters [Internet]. 2006 Mar [cited 2012 Jan 13];256(2):209–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16499608>
11. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic acids research [Internet]. 2000 Jan 1;28(1):27–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102409&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

12. Morais M. Estudos estruturais de Nek de Leishmania braziliensis e busca de potenciais inibidores. 2011.
13. Echeverri. Leishmaniasis en Colombia. I Curso Internacional de Medicina Tropical y Enfermedades Olvidadas. 2007.
14. Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. *Biochimica et biophysica acta* [Internet]. 2005 Dec 30 [cited 2011 Jul 22];1754(1-2):151–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1452262&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies : implications for understanding the life cycle. 2010;33(10):1027–34.
16. Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S, et al. Cutaneous leishmaniasis. 2007;
17. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* [Internet]. 2003 Nov [cited 2012 Mar 18];19(11):502–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492203002484>
18. Mandal S, Moudgil M, Mandal SK. Rational drug design. *European journal of pharmacology* [Internet]. Elsevier B.V.; 2009 Dec 25 [cited 2012 Mar 8];625(1-3):90–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835861>
19. Gane PJ, Dean PM. Recent advances in structure-based rational drug design. *Current opinion in structural biology* [Internet]. 2000 Aug;10(4):401–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10981625>
20. Noble MEM, Endicott J a, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science (New York, N.Y.)* [Internet]. 2004 Mar 19 [cited 2012 Mar 2];303(5665):1800–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031492>
21. Miiller K. On the paradigm shift from rational to random design '. 1997;399(I 997):398–9.
22. Whittle PJ, Blundell TL. PROTEIN STRUCTURE BASED DRUG DESIGN. 1994;
23. Taylor RD, Jewsbury PJ, Essex JW. A review of protein-small molecule docking methods. 2002;151–66.
24. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 Aug [cited 2011 Jul 6];8(8):627–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644473>

25. Asaki TS, Asaki JS, Akai TS, Akasuga ST, Uzuki AS. Metabolism and Functions of Phosphoinositides The Physiology of Phosphoinositides. Society. 2007;30(September):1599–604.
26. McConville MJ, Naderer T. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of Leishmania. Annual Review of Microbiology [Internet]. 2010 Sep 28 [cited 2011 Jun 30];65(1):110301100927028. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-090110-102913>
27. Ishihara H, Shibasaki Y, Kizuki N, Wada T, Yazaki Y, Asano T, et al. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases. Cloning of the third isoform and deletion/substitution analysis of members of this novel lipid kinase family. The Journal of biological chemistry [Internet]. 1998 Apr 10;273(15):8741–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535851>
28. Loijens JC, Anderson R a. Type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases are distinct members of this novel lipid kinase family. The Journal of biological chemistry [Internet]. 1996 Dec 20;271(51):32937–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955136>
29. Heinrich R, Neel BG, Rapoport T a. Mathematical models of protein kinase signal transduction. Molecular cell [Internet]. 2002 May;9(5):957–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049733>
30. Asthagiri a R, Lauffenburger D a. A computational study of feedback effects on signal dynamics in a mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway model. Biotechnology progress [Internet]. 2001;17(2):227–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312698>
31. Smolen PD, Baxter DA, Byrne JH. Mathematical Modeling and Analysis of Intracellular Signaling Pathways. 2003. p. 391–430.
32. Albert R, Wang R-S. Discrete dynamic modeling of cellular signaling networks. Methods in enzymology [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Jul 29];467(09):281–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897097>
33. Klamt S, Saez-rodriguez J, Gilles ED. Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer. BMC Systems Biology. 2007;13:1–13.
34. Samaga R, Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Sorger PK, Klamt S. The logic of EGFR/ErbB signaling: theoretical properties and analysis of high-throughput data. PLoS computational biology [Internet]. 2009 Aug [cited 2013 May 21];5(8):e1000438. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2710522&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
35. Niel ORP. A Boolean Model of Molecular Signaling Pathways. 2009;
36. Eungdamrong NJ, Iyengar R. Modeling cell signaling networks. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization [Internet]. 2004 Jun

[cited 2013 May 25];96(5):355–62. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3620715&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

37. Krumsiek J, Pölsterl S, Wittmann DM, Theis FJ. Odefy--from discrete to continuous models. *BMC bioinformatics* [Internet]. 2010 Jan;11:233. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Samaga R, Klamt S. Modeling approaches for qualitative and semi-quantitative analysis of cellular signaling networks. *Cell communication and signaling : CCS* [Internet]. *Cell Communication and Signaling*; 2013 Jun 26 [cited 2013 Jun 28];11(1):43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23803171>
39. Wittmann DM, Krumsiek J, Saez-Rodriguez J, Lauffenburger D a, Klamt S, Theis FJ. Transforming Boolean models to continuous models: methodology and application to T-cell receptor signaling. *BMC systems biology* [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Jun 24];3:98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2764636&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
40. Myler PJ. Searching the Tritryp genomes for drug targets. *Advances in experimental medicine and biology* [Internet]. 2008. p. 133–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18365664>
41. Altschul SF, Madden TL, Schäffer a a, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* [Internet]. 1997 Sep 1;25(17):3389–402. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Etwiller L, Eddy SR, et al. The Pfam Protein Families Database. 2002;30(1):276–80.
43. R. Bosotti, A. Isacchi ELS. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem, Science*. 2000;3(May):225–7.
44. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and evolution* [Internet]. 2011 May 4 [cited 2011 Jul 18];28(10):2731–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353>
45. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* [Internet]. 2004 Jan [cited 2011 Jun 10];32(5):1792–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=390337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

46. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics (Oxford, England)* [Internet]. 2001 Aug;17(8):754–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11524383>
47. Sigrist CJ a, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, Pagni M, et al. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in bioinformatics* [Internet]. 2002 Sep;3(3):265–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12230035>
48. Ostlund G, Schmitt T, Forslund K, Köstler T, Messina DN, Roopra S, et al. InParanoid 7: new algorithms and tools for eukaryotic orthology analysis. *Nucleic acids research* [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Mar 13];38(Database issue):D196–203. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2808972&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Klamt S, Saez-Rodriguez J, Lindquist J a, Simeoni L, Gilles ED. A methodology for the structural and functional analysis of signaling and regulatory networks. *BMC bioinformatics* [Internet]. 2006 Jan [cited 2013 May 21];7:56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1458363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
50. Manual CellNetAnalyzer. 2012. p. 1–114.
51. Cassel D, Shoubi S, Glusman G, Cukierman E, Rotman M, Zilberstein D. *Leishmania donovani*: characterization of a 38-kDa membrane protein that cross-reacts with the mammalian G-protein transducin. *Experimental parasitology* [Internet]. 1991 May;72(4):411–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2026215>
52. Mirschel S, Steinmetz K, Rempel M, Ginkel M, Gilles ED. P R O M O T : modular modeling for systems biology. 2009;25(5):687–9.
53. Diaz-Gonzalez R, Kuhlmann FM, Galan-Rodriguez C, Madeira da Silva L, Saldivia M, Karver CE, et al. The Susceptibility of Trypanosomatid Pathogens to PI3/mTOR Kinase Inhibitors Affords a New Opportunity for Drug Repurposing. *PLoS neglected tropical diseases* [Internet]. 2011 Aug [cited 2011 Sep 11];5(8):e1297. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160303&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
54. Leever SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Current opinion in cell biology* [Internet]. 1999 Apr;11(2):219–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209156>
55. Mérida I, Avila-Flores A, Merino E. Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *The Biochemical journal* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2011 Jul 26];409(1):1–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18062770>

56. Dubois E, Scherens B, Vierendeels F, Ho MMW, Messenguy F, Shears SB. In *Saccharomyces cerevisiae*, the inositol polyphosphate kinase activity of Kcs1p is required for resistance to salt stress, cell wall integrity, and vacuolar morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2002 Jun 28 [cited 2013 Apr 18];277(26):23755–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956213>
57. Shibata T, Nishikawa M, Matsuoka S, Ueda M. Modeling the self-organized phosphatidylinositol lipid signaling system in chemotactic cells using quantitative image analysis. *Journal of cell science* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2013 Jul 5];125(Pt 21):5138–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899720>
58. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 May 26];1:2005.0010. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1681468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
59. Mueller-roeber B, Pical C. Inositol Phospholipid Metabolism in Arabidopsis . Characterized and Putative Isoforms of Inositol Phospholipid Kinase and Phosphoinositide-Specific Phospholipase C 1. *Plant Physiology*. 2002;130(September):22–46.
60. Einicker-Lamas M, Nascimento MTC, Masuda C a, Oliveira MM, Caruso-Neves C. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: regulation of myo-inositol transport by effectors of protein kinases A and C. *Experimental parasitology* [Internet]. 2007 Oct [cited 2013 May 19];117(2):171–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586497>

ANEXO: TABLAS

Tabla A1. Clasificación de los dominios encontrados en las proteínas de la ruta del fosfstidilinositol en *Leishmania*

modelo	dominios	genes			
		PI4K	PI3K tipo (1A, 1B, 2, 3)	PI3K tipo 2 (1A, 1B)	PIK
1	C2, kA, PIK		LinJ24.2090, LmjF24.2010, LbrM24.2090, LmxM.24.2010, LtaP24.2190, LdBPK_242090.1, Tb927.8.6210, Tc00.1047053511067.4 (-PIK)		
2	C2, kA, PIK, RBD			LinJ14.0020, LmxM14.0020, LdBPK_140020.1, LmjF14.0020 (-C2), Tc00.1047053510167.10, LbrM14.0020 (parc kA, PIK)	
3	PIK	LmjF34.3590, LinJ34.3370, LbrM.20.3170, LmxM.33.3590, LtaP34.3510, LdBPK_343370.1, Tb927.4.1140	LmjF.30.1850, LinJ.30.1840, LmxM.29.1850, LbrM.17.0840, LtaP30.1870, LdBPK_301840.1, Tb11.01.6980, TcIL3000.11.15490 (+FYVE)	Tb927_04_v4	Tc00.1047053506533.34
4	kA, PIK	LmjF29.1450, LinJ29.1550, LbrM29.1540, LmxM.08_29.1450, LtaP29.1600, LdBPK_291550.1, Tb927.3.4020			
5	FAT, PIK, FATC		LmxM.20.1120, LinJ.20.1140, LbrM.20.5280, LmjF.20.1120, LbrM.20.5280, LdBPK_201140.1 (+TFCDC), LmxM.36.6320, LmxM.33.3940, LdBPK_343750.1, Tc00.1047053508997.20, Tb927.1.1930, LbrM.32.1620, LtaP32.1550, LmxM.31.1460, LmjF.32.1460, LinJ.32.1520, LdBPK_321520, Tb11.01.6300		LbrM02.0130, LinJ02.0100, LmjF02.0120, LmxM.02.0120, LdBPK_020100.1, LtaP02.0090, Tb927.2.2260

modelo	dominios				
		PI(4)P5K	PI(3)P5K	IP3 5 (2) phos	IP3 5 phos
6	PIP5K	LmxM.33.3090, LmjF.34.3090, LbrM.34.0560, LmxM.34.0560, LmjF.35.0560, LinJ.35.0560, LmjF.36.0370, LinJ.36.0400, LmxM.36.0370, LbrM.35.0460, LdBPK_360400.1, LdBPK_044320.1, LdBPK_350560.1, LtaP36.0360, LtaP35.0690, LtaP34.3000, Tb927.4.1620, Tb927.10.4770, Tc00.1047053504057.104, Tc00.1047053511001.70	LmjF.27.0890, LmxM.27.0890, LbrM.27.0970, LinJ.27.0750, (+FYVE), Tb11.47.0002 (+TCP1/Cpn 60 chaperonin family), Tc00.1047053506719.10		
		LbrM.31.3050, LinJ.31.2790, LmxM.30.2710, LmjF.31.2710, LtaP31.3140, LdBPK_312790.1, Tc00.1047053508065.50 (MORN+ kinesina)	Tc00.1047053503793.20 (FYVE)		
7	PHOS			LmjF11.1010, LinJ11.1010, LbrM11.0810, LmxM11.1010, LtaP11.0980, LdBPK 111010.1, Tb11.02.4140, Tc00.1047053510101.130	LinJ.15.1210, LmjF.15.1210, LmxM.15.1210, LbrM.15.1160, LtaP15.1140, LdBPK_151210.1, LmxM.33.1220, LinJ.34.1320, LmjF.34.1220, [Tb09.160.4180, Tc00.1047053505977.40 (+Rho gap)

modelo	dominios						
		myo I mono phos	IPOL 1P PHOS	IPoIP Phos (IP5 Phos)	DAK	IPoIP K/IP3 3K	PLC
8	I mono Phos family	LinJ.15.0940, LmxM.15.0880, LmjF.15.0880, LbrM.15.0910, LtaP15.0890, LdBPK_150940.1 (x2), LinJ.17.1510, LmxM.17.1390, LbrM.17.1530, LmjF.17.1390, LtaP17.1530, LdBPK_171510.1, Tb09.160.4620, Tb927.5.2690, Tc00.1047053506579. 30, Tc00.1047053507047. 120	LbrM.31.3290, LinJ.31.3030, LmxM.30.2920, Tc00.104705350789 7.4, Tb927.8.7170, LdBPK 313030, LmjF.31.2920 (x1), LtaP31.3410 (x2),	LbrM.24.0840, LmxM.24.0820, LinJ.24.0840, LmjF.24.0820, LtaP24.0900, LdBPK_240840.1, Tb11.02.3170 (syja n), Tc00.1047053508647. 230			
9	DAGK cat, DAGK acc				LmjF.35.5370, LinJ.35.5060, LmxM.34.5370, LbrM.34.5310, LbrM.16.1340, LinJ.16.1340, LmxM.16.1290, LmjF.16.1290, LtaP16.1280, LtaP34.0020, LdBPK_355060.1, Tb927.8.5140, Tc00.1047053511217 .30		
10	IPK					LbrM.14.0340, LinJ.14.0340, LmjF.14.0340, LmxM.14.0340, LdBPK_140340.1, Tb927.7.4400, Tc00.1047053504213 .90	

11	PLC X						Tb11.02.3780, LbrM.22.1590, LinJ.22.1530, LmjF.30.2950, LmxM.22.1680, LtaP22.1650, Tc00.1047053504149.1 60, [LdBPK 350040, LtaP35.0150, LmjF.22.1680, LbrM.34.0080, LinJ.35.0040, LmjF.35.0040, LmxM.34.0040 (-C2)
	PLC Y, C2						LinJ.30.2970, LmxM.29.2950, LdBPK 302970 (+ EF hand 5)

modelo	dominios						
		CDIPT	CDP-DG	PTEN	Calmodulina	PKC	IP3R
12	CDP-OH P trans	LbrM.26.2410, LinJ.26.2500, LmjF.26.2480, LmxM.26.2480, LtaP26.2630, LdBPK 262500, Tb09.160.0530, Tc00.1047053510349.50					

13	CTP trans 1		LmjF.26.1620, LinJ.26.1600, LbrM.26.1640, LmxM.26.1620, LtaP26.1650, LdBPK 261600, Tb927.7.220, Tc00.1047053511237.40, LbrM.32.3110, LdBPK 323010, LinJ.32.3010, LmjF.32.2870, LmxM.31.2870, LtaP32.3050, Tc00.1047053509073.70				
14	PTEN C2, DSPc			LbrM.14.1280, LinJ.34.1530, LmjF.34.1430, LmxM.33.1430, LtaP34.1660, LdBPK 341530, Tc00.1047053506637.100, Tb11.01.5450 (-PTEN)			
15	EF hand 5, efhand				LinJ.09.0970, LbrM.09.0970, LmjF.09.0930, LmxM.09.0930, LdBPK 090970, Tb11.01.4622, Tc00.1047053507483.39		
16	PRKCSH					LbrM.26.1010, Tc00.1047053508215.9	
	PRKCSH 1					LmjF.26.1000, LmxM.26.1000, LtaP26.0920, Tb927.7.940, LinJ.26.0970, LdBPK 260970	
17	Inositol 1,4,5 rec RIH assoc						LinJ.16.0290, LmjF.16.0280, LmxM.16.0280, LtaP16.0280, LdBPK 160290

Tabla A2. Resultado Delta-Blast de las proteínas de la ruta contra las proteínas en humanos, mostrando valores como el porcentaje de identidad y el valor E.

Gen												
calmodulina	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 726 hits found												
LinJ.09.0970	gi 377656675 pdb 4DJC A	89.93	97.99	149	15	0	1	149	4	152	5,00E-52	167
	gi 377656675 pdb 4DJC A	28.45	46.55	116	81	2	35	149	2	116	9,00E-21	86.7
	gi 226887604 pdb 2WEL D	89.93	97.99	149	15	0	1	149	2	150	1,00E-51	167
	gi 66360457 pdb 1XFU O	89.26	97.99	149	16	0	1	149	1	149	1,00E-51	166
	gi 83754384 pdb 2BE6 A	89.93	97.99	149	15	0	1	149	1	149	1,00E-51	166
	gi 83754386 pdb 2BE6 B	41.67	63.89	72	42	0	6	77	79	150	7,00E-18	79.0
	gi 4502549 ref NP_001734.1	89.93	97.99	149	15	0	1	149	1	149	1,00E-51	166
	gi 640285 pdb 1CDL A	89.80	97.96	147	15	0	2	148	1	147	4,00E-51	165
CDPIPT	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 31 hits found												
LbrM.26.2410	gi 5453906 ref NP_006310.1	34.91	52.36	212	131	3	13	222	6	212	1,00E-29	114
	gi 62896911 dbj BAD96396.1	34.43	51.89	212	132	3	13	222	6	212	7,00E-29	112
	gi 119600384 gb EAW79978.1	33.51	51.35	185	116	3	40	222	5	184	1,00E-22	94.7
	gi 50949451 emb CAH10649.1	25.00	44.17	120	83	4	5	121	69	184	3,00E-16	77.4
	gi 10092647 ref NP_061968.1	25.00	44.17	120	83	4	5	121	96	211	4,00E-16	77.4
	gi 7340970 gb AAF61194.1 AF138862_1	18.75	26.79	112	78	3	15	114	82	192	6,00E-16	77.0

CDP-DG	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score
# 92 hits found												
LbrM.26.1640	gi 20143480 ref NP_003809.1	34.16	48.88	401	251	5	4	393	3	401	1,00E-98	307
	gi 193786582 dbj BAG51366.1	34.16	49.13	401	251	5	4	393	3	401	3,00E-98	306
	gi 193785541 dbj BAG50907.1	34.16	48.63	401	251	5	4	393	3	401	3,00E-98	306
	gi 22035624 ref NP_001254.2	34.76	51.60	374	234	4	25	393	50	418	9,00E-96	301
	gi 1620512 gb AAC50735.1	34.76	51.60	374	234	4	25	393	50	418	1,00E-95	300
	gi 3892191 gb AAC78305.1	36.98	51.78	338	206	3	61	393	42	377	2,00E-95	299
	gi 194388268 dbj BAG65518.1	40.66	54.58	273	155	3	126	393	11	281	8,00E-80	255
	gi 194382614 dbj BAG64477.1	42.53	52.94	221	76	1	173	393	2	171	8,00E-57	191
	gi 119630830 gb EAX10425.1	31.28	46.09	243	162	2	74	311	1	243	3,00E-51	178
DAK	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score
# 133 hits found												
LmjF.35.5370	gi 85662662 gb AAI12364.1	23.82	38.74	382	234	15	13	366	392	744	2,00E-88	288
	gi 124256482 ref NP_001074214.1	23.82	38.74	382	234	15	13	366	392	744	2,00E-88	288
	gi 516758 dbj BAA05132.1	23.82	38.74	382	234	15	13	366	431	783	3,00E-88	288
	gi 189054351 dbj BAG36871.1	23.82	38.74	382	234	15	13	366	431	783	3,00E-88	288
	gi 124256476 ref NP_001337.2	23.82	38.74	382	234	15	13	366	431	783	3,00E-88	288
	gi 119598608 gb EAW78202.1	23.82	38.74	382	234	15	13	366	431	783	3,00E-88	288
	gi 58041815 gb AAW63408.1	23.56	38.74	382	235	15	13	366	392	744	5,00E-88	287

IP(3)5 phos 2	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score
# 83 hits found												
LbrM.11.0810	gi 301598678 pdb 3N9V A	15.92	28.36	201	124	8	92	288	83	242	3,00E-39	148
	gi 299856846 pdb 3MTC A	15.92	28.36	201	124	8	92	288	86	245	3,00E-39	148
	gi 194384652 dbj BAG59486.1	18.63	30.88	204	120	9	86	288	17	175	4,00E-39	154
	gi 296010889 ref NP_001171559.1	18.63	30.88	204	120	9	86	288	385	543	7,00E-39	154
	gi 25361067 gb AAN73051.1	18.63	30.88	204	120	9	86	288	622	780	8,00E-39	154
	gi 4104822 gb AAD02178.1	18.63	30.88	204	120	9	86	288	569	727	9,00E-39	154
	gi 26190608 ref NP_003889.1	18.63	30.88	204	120	9	86	288	622	780	9,00E-39	154
	gi 106731 pir A41075	17.05	28.57	217	135	8	92	304	140	315	1,00E-38	150
IP(3)5 phos	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score
# 250 hits found												
LinJ.15.1210	gi 63100298 gb AAH94726.1	24.46	40.48	793	492	19	5	782	188	888	0.0	627
	gi 13325070 ref NP_001578.2	24.46	40.48	793	492	19	5	782	188	888	0.0	626
	gi 119632235 gb EAX11830.1	24.46	40.48	793	492	19	5	782	191	891	0.0	626
	gi 13249985 gb AAA59964.2	24.46	40.48	793	492	19	5	782	263	963	0.0	627
	gi 13325072 ref NP_000267.2	24.34	40.07	801	491	19	5	782	188	896	0.0	624
	gi 158259675 dbj BAF85796.1	24.34	40.07	801	491	19	5	782	188	896	0.0	624
	gi 228953 prf 1814461A	24.34	40.48	793	493	19	5	782	265	965	0.0	626
	gi 219518136 gb AAI44107.1	24.34	40.35	793	493	19	5	782	188	888	0.0	621
IP3R	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score
# 896 hits												

found													
LinJ.16.0290	gi 148921515 gb AAI46647.1	23.14	34.70	389	224	13	10	344	2	369	3,00E-60	230	
	gi 95147335 ref NP_002214.2	22.16	35.05	388	226	14	11	344	4	369	2,00E-59	231	
	gi 95147335 ref NP_002214.2	23.23	36.77	155	105	3	1964	2105	1872	2025	6,00E-31	137	
	gi 95147335 ref NP_002214.2	24.77	40.97	537	286	19	2310	2770	2140	2634	9,00E-29	130	
	gi 450469 dbj BAA05384.1	22.16	35.05	388	226	14	11	344	4	369	2,00E-59	231	
	gi 450469 dbj BAA05384.1	23.23	36.77	155	105	3	1964	2105	1872	2025	6,00E-31	137	
	gi 450469 dbj BAA05384.1	24.77	40.97	537	286	19	2310	2770	2140	2634	9,00E-29	130	
IPoIP K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score	
# 92 hits found													
LbrM.14.0340	gi 77799906 dbj BAB71225.2	28.50	46.73	214	122	3	858	1043	87	297	2,00E-73	249	
	gi 16305265 gb AAL17053.1 AF393812_1	28.50	46.73	214	122	3	858	1043	193	403	2,00E-72	249	
	gi 55769530 ref NP_473452.2	28.50	46.73	214	122	3	858	1043	193	403	2,00E-72	249	
	gi 62898876 dbj BAD97292.1	28.50	46.73	214	122	3	858	1043	193	403	2,00E-72	249	
	gi 158260893 dbj BAF82624.1	28.04	46.26	214	123	3	858	1043	193	403	1,00E-70	245	
	gi 55769518 ref NP_001006115.1	26.09	44.35	230	118	3	863	1043	42	268	2,00E-69	237	
	gi 5911911 emb CAB55936.1	28.07	45.61	228	124	3	853	1043	118	342	4,00E-68	236	
Myo Mono I Phos	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score	
# 840 hits found													
LinJ.15.0940	gi 119607503 gb EAW87097.1	26.58	48.73	158	96	2	301	458	93	230	3,00E-38	143	
	gi 119607503 gb EAW87097.1	10.61	25.25	198	110	3	24	218	6	139	4,00E-13	71.6	

	gi 119607504 gb EAW87098.1	26.28	48.08	156	95	2	303	458	1	136	5,00E-38	139
	gi 5031789 ref NP_005527.1	26.58	48.73	158	96	2	301	458	128	265	1,00E-37	143
	gi 5031789 ref NP_005527.1	26.59	35.82	201	127	4	24	218	6	174	2,00E-36	139
	gi 443382 pdb 2HHM A	26.60	48.73	158	96	2	301	458	127	264	1,00E-37	142
	gi 443382 pdb 2HHM A	26.61	35.82	201	127	4	24	218	5	173	3,00E-36	139
PI(3)P5K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 282 hits found												
LmjF.27.0890	gi 4589606 dbj BAA76825.1	25.94	43.44	320	179	7	1445	1756	305	574	3,00E-87	302
	gi 119582870 gb EAW62466.1	18.16	27.86	402	180	13	1438	1760	26	357	6,00E-82	283
	gi 21749863 dbj BAC03674.1	25.62	43.12	320	180	7	1445	1756	753	1022	7,00E-82	296
	gi 119590855 gb EAW70449.1	25.94	43.44	320	179	7	1445	1756	1506	1775	7,00E-82	302
	gi 119590855 gb EAW70449.1	19.29	37.01	254	175	7	462	704	318	552	2,00E-70	265
	gi 119590850 gb EAW70444.1	25.94	43.44	320	179	7	1445	1756	1728	1997	9,00E-82	302
	gi 119590850 gb EAW70444.1	19.29	37.01	254	175	7	462	704	540	774	2,00E-70	265
	gi 38385739 gb AAR19397.1	25.94	43.44	320	179	7	1445	1756	1825	2094	1,00E-81	302
	gi 38385739 gb AAR19397.1	19.29	37.01	254	175	7	462	704	637	871	2,00E-70	265
PI(4)P5K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 96 hits found												
LmxM.33.3090	gi 208431776 ref NP_001129109.1	27.87	43.10	348	218	8	209	545	111	436	3,00E-133	403
	gi 4505815 ref NP_003548.1	27.87	43.10	348	218	8	209	545	111	436	2,00E-132	402
	gi 208431778 ref NP_001129110.1	27.87	43.10	348	218	8	209	545	124	449	3,00E-132	402
	gi 194380652 dbj BAG58479.	28.99	46.38	345	220	6	209	545	68	395	4,00E-128	390

	1											
	gi 119582870 gb EAW62466.1	28.99	46.38	345	220	6	209	545	15	342	5,00E-128	388
	gi 4505817 ref NP_003549.1	28.99	46.38	345	220	6	209	545	68	395	6,00E-128	390
	gi 2138074 gb AAC51327.1	28.99	46.38	345	220	6	209	545	68	395	7,00E-128	390
	gi 307691174 ref NP_001182662.1	28.61	44.51	346	218	6	209	545	118	443	1,00E-127	393
PI(4)P5K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 337 hits found												
LbrM.31.3050	gi 62088160 dbj BAD92527.1	17.63	32.74	675	504	15	420	1047	149	818	2,00E-125	410
	gi 397506506 ref XP_003823768.1	17.63	32.74	675	504	15	420	1047	127	796	4,00E-125	409
	gi 119603360 gb EAW82954.1	17.63	32.74	675	504	15	420	1047	133	802	5,00E-125	409
	gi 94536858 ref NP_005541.3	17.63	32.74	675	504	15	420	1047	105	774	5,00E-125	408
	gi 194294510 ref NP_001123572.1	17.63	32.74	675	504	15	420	1047	105	774	2,00E-124	406
	gi 221042706 dbj BAH13030.1	16.97	33.38	719	538	15	383	1047	3	716	8,00E-121	395
	gi 221044234 dbj BAH13794.1	17.78	32.74	675	503	15	420	1047	3	672	1,00E-120	393
	gi 33875771 gb AAH00712.2	17.07	32.83	533	379	12	571	1044	190	718	8,00E-120	391
PI(4)P5K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 101 hits found												
LmjF.36.0370	gi 208431776 ref NP_001129109.1	20.73	35.12	410	263	6	45	446	82	437	3,00E-132	397
	gi 4505815 ref NP_003548.1	20.73	35.12	410	263	6	45	446	82	437	2,00E-131	396
	gi 208431778 ref NP_001129110.1	20.73	35.12	410	263	6	45	446	95	450	3,00E-131	397
	gi 194376204 dbj BAG62861.1	20.35	34.99	403	259	6	52	446	96	444	2,00E-130	397

	1												
	gi 307691174 ref NP_001182662.1	20.35	34.99	403	259	6	52	446	96	444	3,00E-130	397	
	gi 221045212 dbj BAH14283.1	20.35	34.99	403	259	6	52	446	96	444	3,00E-130	396	
	gi 31317309 ref NP_036530.1	20.35	34.99	403	259	6	52	446	96	444	5,00E-130	397	
	gi 3043702 dbj BAA25515.1	20.35	34.99	403	259	6	52	446	115	463	8,00E-130	397	
PI3K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score	
# 269 hits found													
LmjF.30.1850	gi 119599375 gb EAW78969.1	17.26	35.53	197	130	5	1043	1206	1374	1570	1,00E-50	199	
	gi 62087274 dbj BAD92084.1	15.07	31.05	219	131	5	1043	1206	159	377	3,00E-50	189	
	gi 806955 gb AAB32956.1	19.26	35.66	244	138	7	1021	1205	44	287	4,00E-50	187	
	gi 13097276 gb AAH03393.1	22.81	36.26	171	110	4	1054	1202	18	188	7,00E-49	181	
	gi 193785218 dbj BAG54371.1	19.26	35.66	244	138	7	1021	1205	356	599	7,00E-48	187	
	gi 1653996 emb CAA70298.1	15.07	31.05	219	131	5	1043	1206	2313	2531	2,00E-47	189	
	gi 157266317 ref NP_001175.2	15.07	31.05	219	131	5	1043	1206	2313	2531	2,00E-47	189	
	gi 62087250 dbj BAD92072.1	20.33	34.62	182	123	4	1050	1209	573	754	5,00E-47	185	
PI3K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score	
# 436 hits found													
LbrM.24.2090	gi 194391206 dbj BAG60721.1	42.64	63.77	265	142	2	830	1088	563	823	7,00E-106	349	
	gi 194391206 dbj BAG60721.1	22.34	40.16	376	215	16	132	483	24	346	2,00E-58	212	
	gi 194391206 dbj BAG60721.1	21.55	37.93	116	86	2	658	773	468	578	1,00E-21	96.3	
	gi 194391206 dbj BAG60721.1	30.30	51.52	33	23	0	480	512	406	438	5,00E-09	55.5	

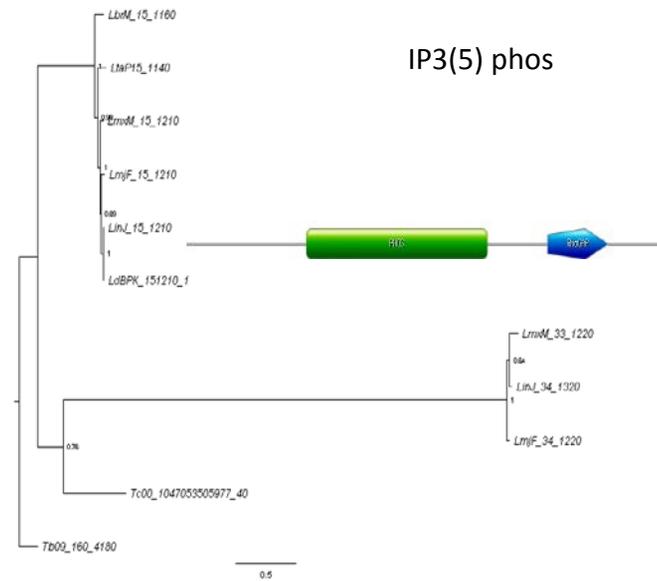
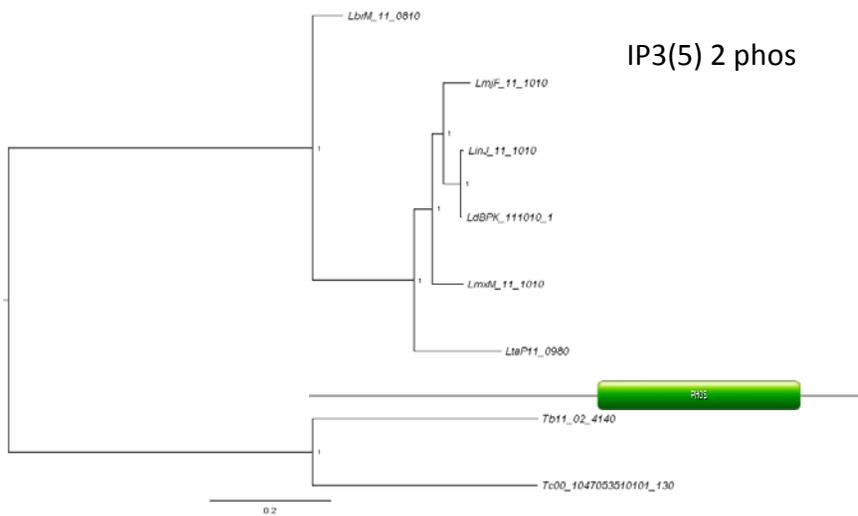
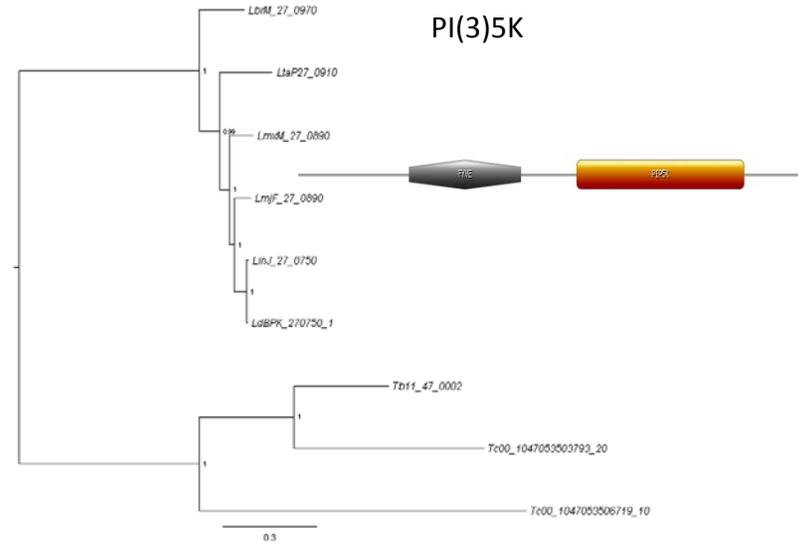
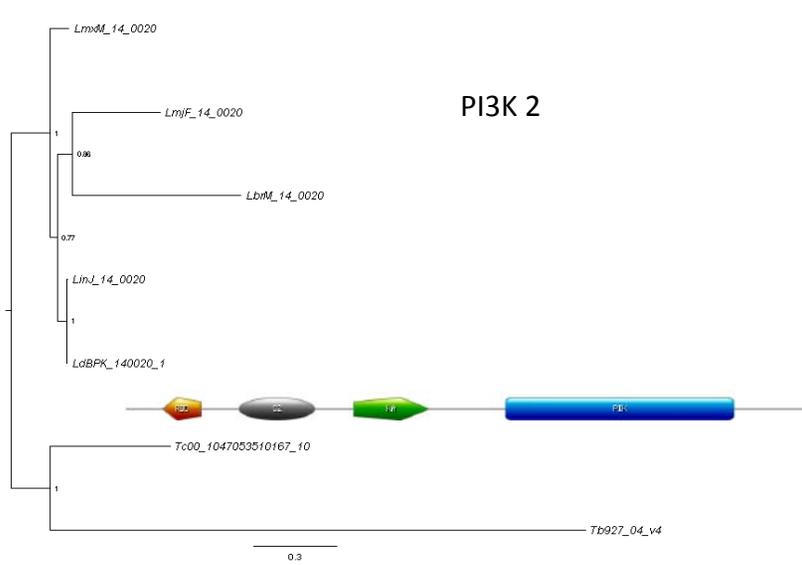
	gi 34761064 ref NP_002638.2	42.64	63.77	265	142	2	830	1088	626	886	3,00E-105	349
	gi 34761064 ref NP_002638.2	21.21	38.46	429	239	19	79	483	56	409	1,00E-63	228
	gi 34761064 ref NP_002638.2	21.55	37.93	116	86	2	658	773	531	641	1,00E-21	96.3
	gi 34761064 ref NP_002638.2	30.30	51.52	33	23	0	480	512	469	501	5,00E-09	55.5
	gi 987948 emb CAA87094.1	42.64	64.91	265	142	3	830	1088	626	886	6,00E-103	343
PI3K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 1081 hits found												
LmxM.20.1120	gi 11136977 emb CAC15570.1	22.81	38.20	1254	778	38	2109	3263	26	1188	0.0	763
	gi 119592087 gb EAW71681.1	22.81	38.20	1254	778	38	2109	3263	1338	2500	0.0	763
	gi 3282239 gb AAC39933.1	22.81	38.20	1254	778	38	2109	3263	1386	2548	0.0	763
	gi 4826730 ref NP_004949.1	22.81	38.20	1254	778	38	2109	3263	1387	2549	0.0	763
	gi 68533045 dbj BAE06077.1	22.81	38.20	1254	778	38	2109	3263	1421	2583	0.0	763
	gi 744518 prf 2014422A	22.65	38.04	1254	780	38	2109	3263	1387	2549	0.0	759
	gi 193785218 dbj BAG54371.1	29.22	45.43	722	450	14	2566	3263	70	754	0.0	592
	gi 14530309 emb CAC42395.1	20.54	36.43	969	610	34	2183	3071	7	895	7,00E-167	546
PI3K 2	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 227 hits found												
LinJ.14.0020	gi 194380178 dbj BAG63856.1	30.53	47.44	917	535	21	177	1047	82	942	0.0	869
	gi 68533095 dbj BAE06102.1	30.43	47.55	917	536	21	177	1047	205	1065	0.0	867
	gi 54792082 ref NP_006209.2	30.43	47.55	917	536	21	177	1047	204	1064	0.0	867
	gi 163931056 pdb 2RD0 A	30.43	47.55	917	536	21	177	1047	232	1092	0.0	868

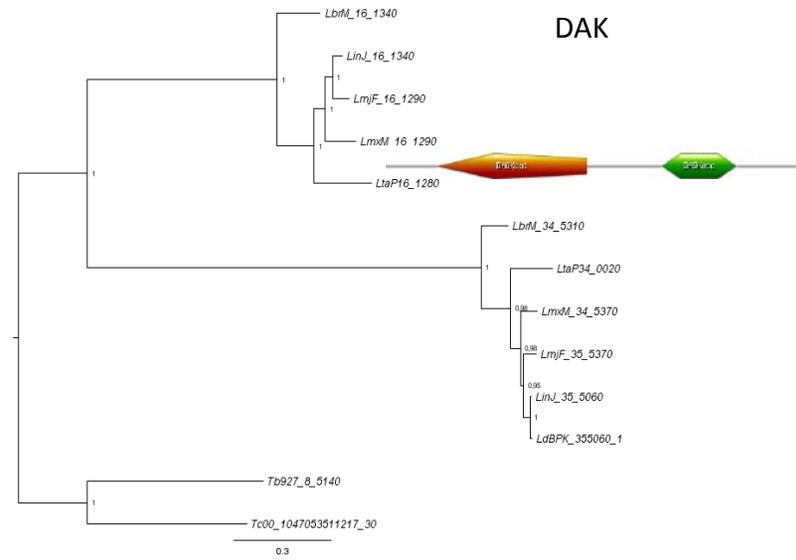
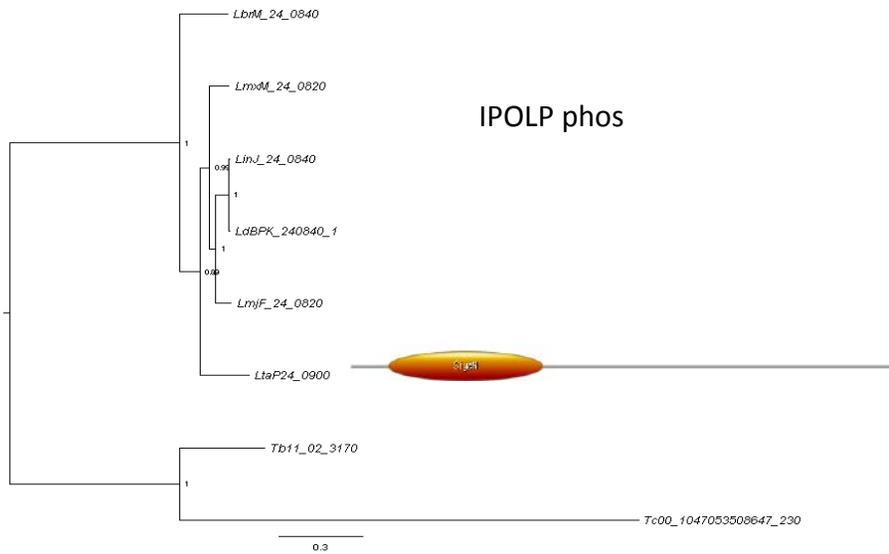
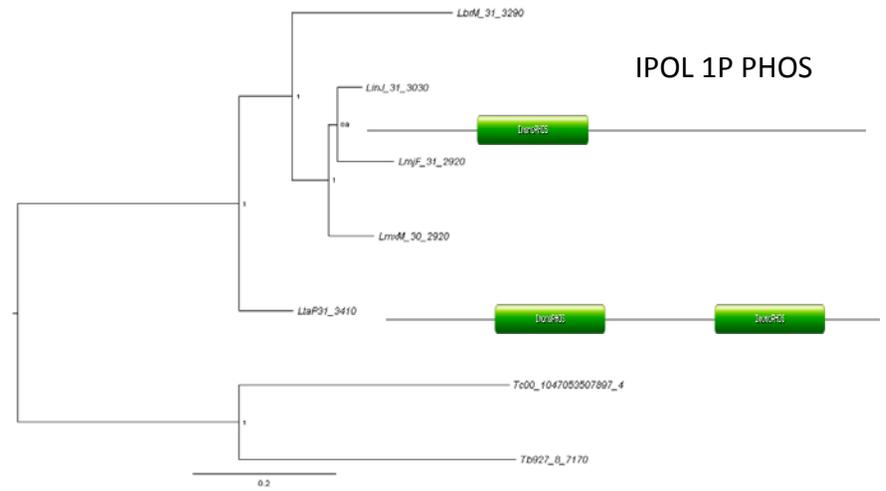
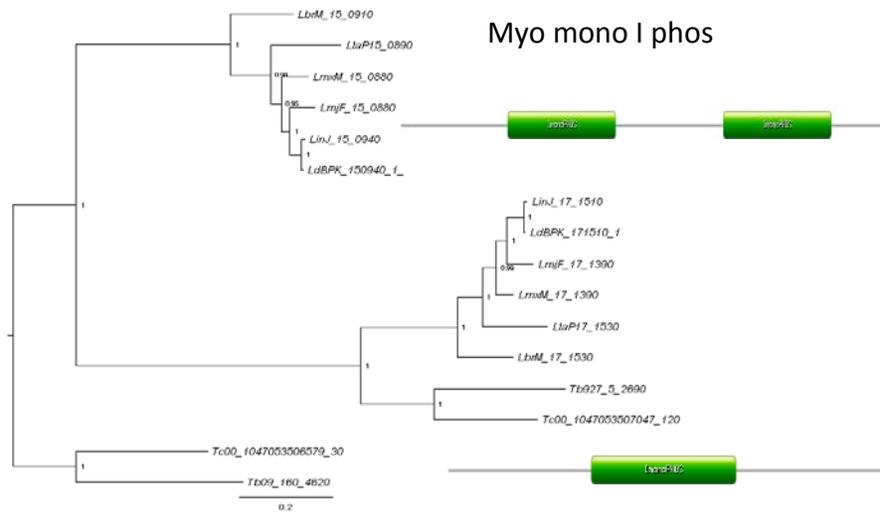
	gi 260099968 pdb 3HIZ A	30.43	47.55	917	536	21	177	1047	232	1092	0.0	868
	gi 260099958 pdb 3HHM A	30.43	47.55	917	536	21	177	1047	227	1087	0.0	867
	gi 158259341 dbj BAF85629.1	30.32	47.55	917	537	21	177	1047	204	1064	0.0	865
PI4K	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 228 hits found												
LmjF.29.1450	gi 32425423 gb AAH18120.2	25.77	44.02	970	600	27	1735	2661	10	902	0.0	608
	gi 32197216 gb AAH53654.1	25.67	43.92	970	601	27	1735	2661	2	894	0.0	605
	gi 4505807 ref NP_002641.1	30.41	49.49	592	368	10	2084	2661	292	853	0.0	593
	gi 189054544 dbj BAG37317.1	30.41	49.49	592	368	10	2084	2661	292	853	0.0	593
	gi 2326227 gb AAD13352.1	25.68	43.71	993	614	28	1712	2661	1132	2043	6,00E-179	610
	gi 218512114 sp P42356.3 PI4KA_HUMAN	25.68	43.71	993	614	28	1712	2661	1132	2043	6,00E-179	610
	gi 348041302 ref NP_477352.3	25.68	43.71	993	614	28	1712	2661	1190	2101	1,00E-178	610
	gi 68533059 dbj BAE06084.1	25.68	43.71	993	614	28	1712	2661	1209	2120	1,00E-178	610
PIK	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 171 hits found												
LbrM.02.0130	gi 194389488 dbj BAG61705.1	32.19	51.71	671	402	21	4275	4924	452	1090	6,00E-135	453
	gi 119587515 gb EAW67111.1	32.19	51.71	671	402	21	4275	4924	1070	1708	8,00E-131	453
	gi 870786 gb AAA86520.1	32.04	51.56	671	403	21	4275	4924	1070	1708	1,00E-130	453
	gi 71902540 ref NP_000042.3	32.19	51.71	671	402	21	4275	4924	2418	3056	5,00E-129	453
	gi 317373479 sp Q13315.3 ATM_HUMAN	32.19	51.71	671	402	21	4275	4924	2418	3056	5,00E-129	453
	gi 1497931 gb AAB38309.1	32.04	51.56	671	403	21	4275	4924	2418	3056	7,00E-129	453
	gi 1063621 gb AAC50289.1	32.04	51.56	671	403	21	4275	4924	2418	3056	7,00E-129	453

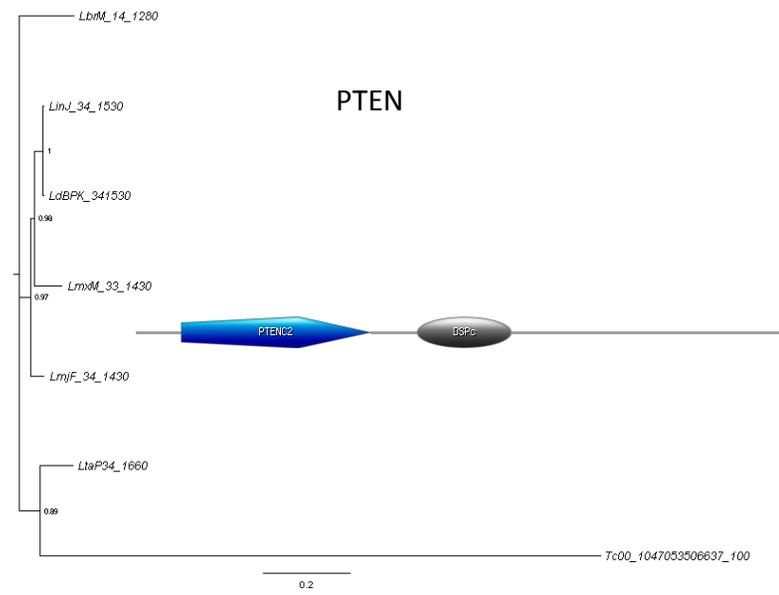
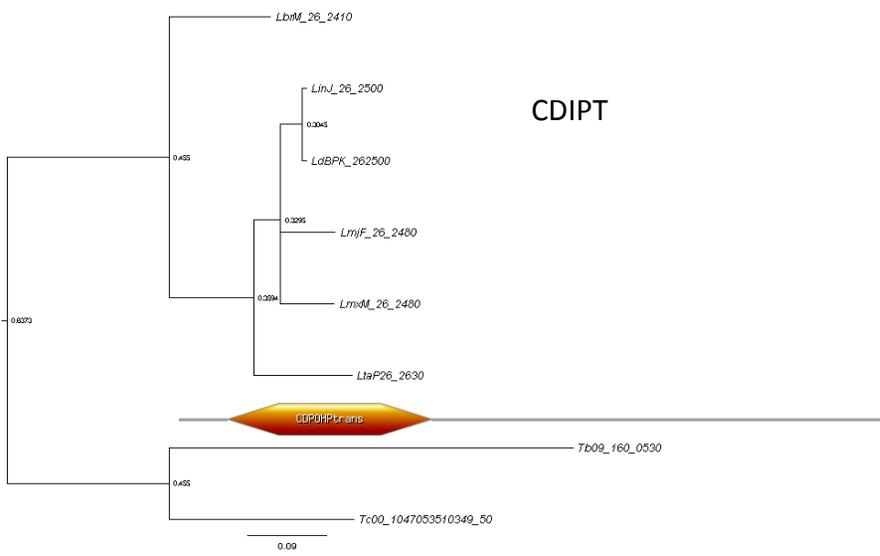
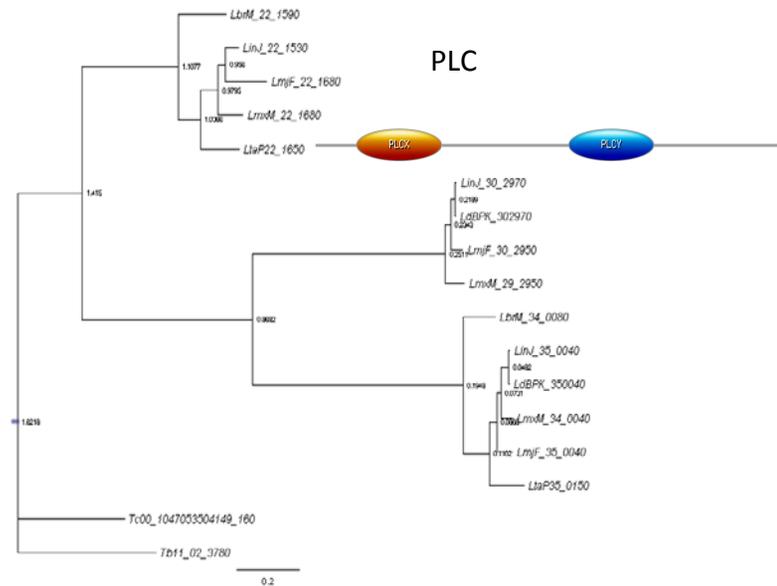
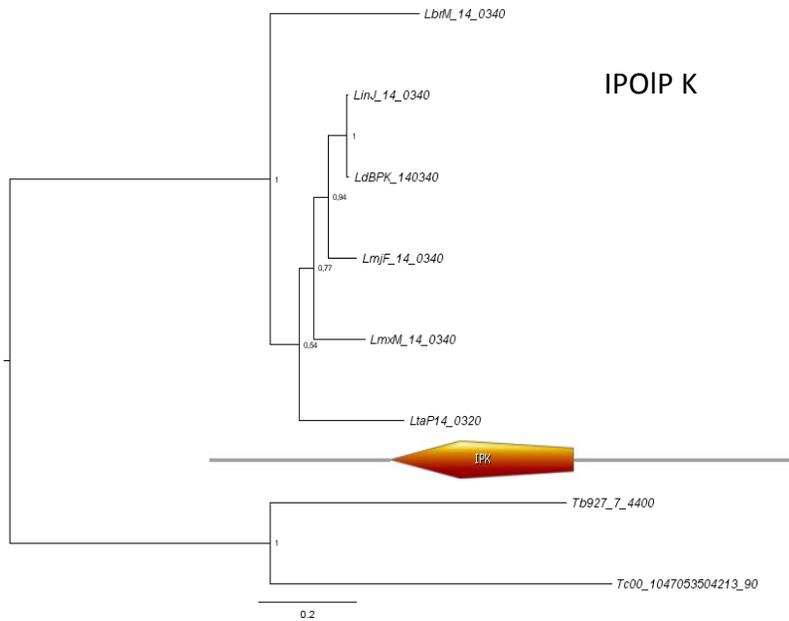
	gi 1585222 prf 2124355A	32.04	51.56	671	403	21	4275	4924	2418	3056	7,00E-129	453
PKC	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 1001 hits found												
LbrM.26.1010	gi 182855 gb AAA52493.1	33.19	46.38	235	132	5	14	245	11	223	6,00E-29	122
	gi 182855 gb AAA52493.1	29.90	44.33	97	60	2	391	487	415	503	2,00E-14	78.2
	gi 48255889 ref NP_002734.2	33.19	46.38	235	132	5	14	245	11	223	6,00E-29	122
	gi 48255889 ref NP_002734.2	29.90	44.33	97	60	2	391	487	416	504	2,00E-14	78.2
	gi 119604623 gb EAW84217.1	33.19	46.38	235	132	5	14	245	11	223	6,00E-29	118
	gi 119604622 gb EAW84216.1	33.19	46.38	235	132	5	14	245	11	223	7,00E-29	121
	gi 119604622 gb EAW84216.1	29.90	44.33	97	60	2	391	487	412	500	2,00E-14	78.2
PLC	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evaluate	bit score
# 374 hits found												
LbrM.22.1590	gi 14249340 ref NP_116115.1	31.00	48.33	629	405	11	98	707	137	755	0.0	637
	gi 62897967 dbj BAD96923.1	31.00	48.33	629	405	11	98	707	137	755	0.0	637
	gi 119591033 gb EAW70627.1	31.30	48.64	623	399	11	104	707	140	752	0.0	635
	gi 32425752 gb AAH10668.2	31.25	47.20	608	394	11	108	706	23	615	0.0	585
	gi 119584687 gb EAW64283.1	29.14	47.04	659	417	15	82	710	247	885	0.0	595
	gi 18916814 dbj BAB85550.1	30.25	46.55	638	417	12	82	706	133	755	0.0	586
	gi 19115964 ref NP_588614.1	30.25	46.55	638	417	12	82	706	165	787	0.0	586
	gi 5689521 dbj BAA83044.1	29.14	47.04	659	417	15	82	710	274	912	0.0	597

PTEN	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score
# 350 hits found												
LbrM.14.1280	gi 118764003 gb AAI28147.1	28.09	45.62	388	213	10	184	567	85	410	5,00E-49	179
	gi 213972593 ref NP_001135440.1	28.09	45.36	388	213	10	184	567	85	410	7,00E-49	179
	gi 213972589 ref NP_570141.3	28.09	45.36	388	213	10	184	567	119	444	1,00E-48	179
	gi 17385401 emb CAD13144.1	28.09	45.36	388	213	10	184	567	119	444	1,00E-48	179
	gi 119628625 gb EAX08220.1	28.09	45.36	388	213	10	184	567	214	539	6,00E-48	179
	gi 213972591 ref NP_954863.2	28.09	45.36	388	213	10	184	567	196	521	8,00E-48	178
	gi 37788918 gb AAP45146.1	28.09	45.36	388	213	10	184	567	196	521	8,00E-48	178
	gi 119628627 gb EAX08222.1	28.09	45.36	388	213	10	184	567	246	571	9,00E-48	179
IPOL 1P PHOS	subject ids	% identity	% positives	alignment length	mismatches	gap opens	q. start	q. end	s. start	s. end	evalue	bit score
# 33 hits found												
LbrM.31.3290	gi 119613713 gb EAW93307.1	19.94	33.33	336	191	9	56	389	15	274	9,00E-51	178
	gi 17389533 gb AAH17801.1	19.35	32.84	341	197	9	56	394	15	279	1,00E-50	178
	gi 116812595 ref NP_006076.4	19.94	33.53	346	206	8	50	393	2	278	5,00E-50	176
	gi 226887602 pdb 2WEF A	19.71	32.94	340	195	9	56	393	11	274	9,00E-50	176
	gi 6688197 emb CAB65115.1	19.65	33.24	346	207	8	50	393	2	278	4,00E-48	171
	gi 5031789 ref NP_005527.1	13.65	26.18	359	213	11	64	420	12	275	1,00E-45	164

ANEXO: FIGURAS







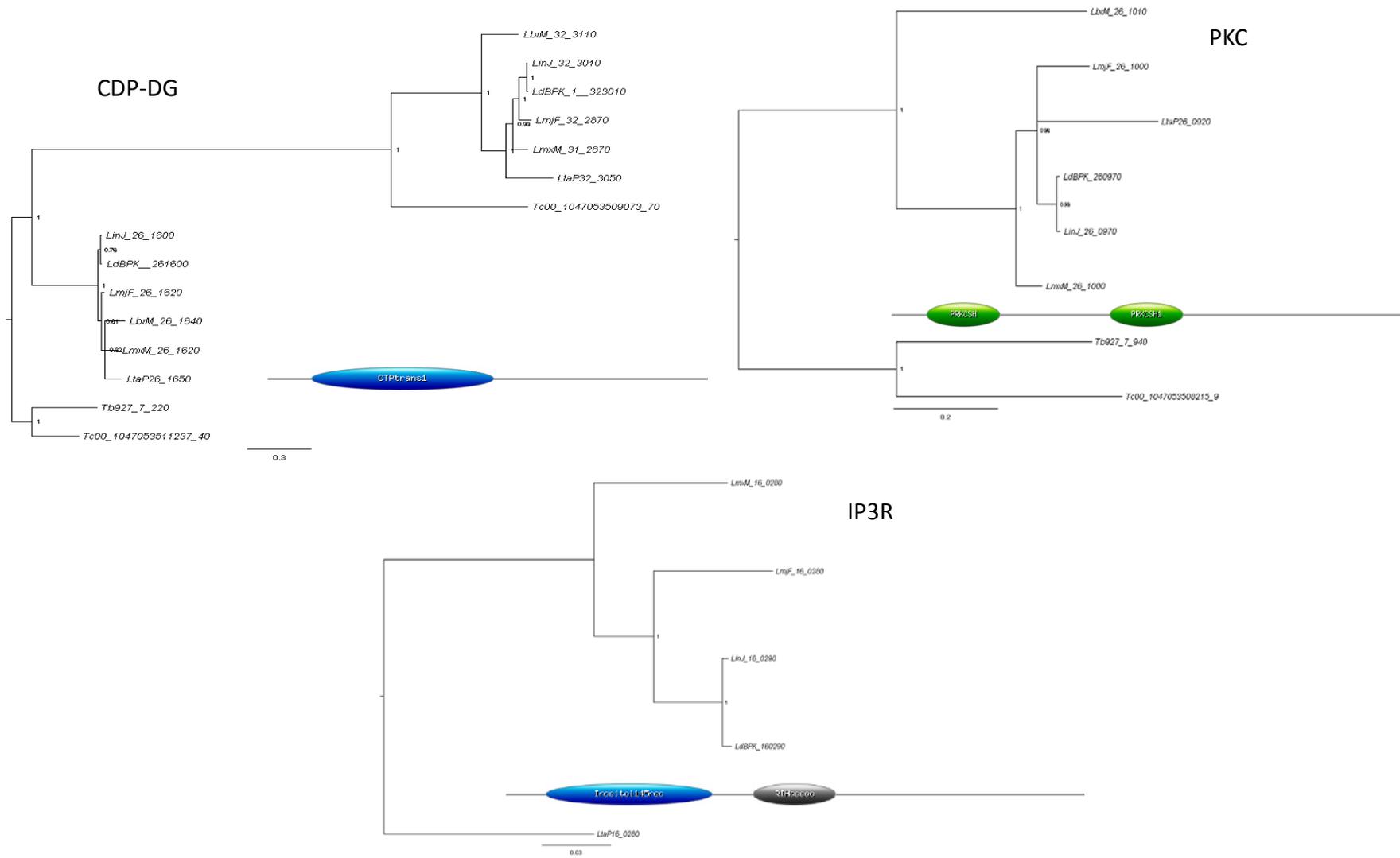


Figura A1. Árboles obtenidos a partir del análisis bayesiano de las proteínas de la ruta del fosfatidilinositol asociadas a los dominios encontrados en cada una.