



# Estrategias celulares y moleculares en el cribado de nuevos agentes anti-*Leishmania*

David Moreno Mateos  
2010

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Universidad de Alcalá

ESTRATEGIAS CELULARES Y MOLECULARES EN EL CRIBADO DE NUEVOS AGENTES ANTI-*LEISHMANIA* – David Moreno Mateos 2010

ISBN 978-84-693-3249-8

Tesis Doctoral

Estrategias celulares y moleculares  
en el cribado de nuevos agentes  
anti-*Leishmania*

David Moreno Mateos  
2010

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Universidad de Alcalá

**ISBN: 978-84-693-3249-8**

**Antonio Jiménez Ruiz**, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y **Federico Gago Badenas**, Catedrático de Universidad del Departamento de Farmacología de la Universidad de Alcalá,

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por **David Moreno Mateos**, titulado “Estrategias celulares y moleculares en el cribado de nuevos agentes anti-*Leishmania*” dentro del programa de doctorado “Señalización celular y patologías asociadas”, ha sido realizado bajo nuestra dirección y, a nuestro juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que el interesado opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, a 9 de Junio de 2010

Dr. Antonio Jiménez Ruiz

Dr. Federico Gago Badenas



**Pilar Sancho López**, Subdirectora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título **“Estrategias celulares y moleculares en el cribado de nuevos agentes anti-*Leishmania*”** ha sido realizada por **David Moreno Mateos** en este Departamento, bajo la dirección de los doctores **D. Antonio Jiménez Ruiz** y **D. Federico Gago Badenas**, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que el interesado opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, a 9 de Junio de 2010

Dra. Pilar Sancho López



## Gracias.

Vaya por delante para todos los nombres que van salir por aquí. Y para los que no, que soy un desastre para según que cosas, así que seguro que me olvido de alguien. Si cuando acabes de leer esto piensas que es raro que tu nombre no esté aquí, culpa mía, tienes todo el derecho en ir a por mí y darme la colleja que me he ganado.

Gracias papá porque nunca se te han caído los anillos para sacar a tu familia adelante. Por partirme la espalda para darnos a Raúl y a mí la oportunidad y los medios, para que fuéramos todo lo que quisiéramos ser y por enseñarme que las cosas se consiguen con esfuerzo. Gracias mamá por un amor incondicional y por aguantar a un hijo que te llama menos de lo que debiera. Estoy aquí gracias a vosotros. Os quiero.

Gracias Antonio y Federico. Hace más de cinco años me abristeis la puerta de vuestro laboratorio que también se convirtió en el mío. Eran tiempos distintos (aplidina...), pero el hambre por saber es la misma hoy en día. He aprendido mucho con y de vosotros y sé que cuando me vaya del labo dejaré a “mis dos jefes”, pero me llevaré dos muy buenos amigos, espero que para mucho más de cinco años.

Juan, gracias por muchísimas cosas. Por ser el as en la manga de nuestro laboratorio, siempre con buenas ideas y mejores consejos. Gracias por enseñarme cómo trabaja un científico; pero sobre todo, gracias por ser mi amigo y estar ahí siempre que te he necesitado. Más tarde o más temprano aceptaré tu invitación pa’Medellín. Palabra.

Eva, gracias por todo lo bueno que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio, que es una mucho. Viajes, cenas, fiestas, disfraces, Coruña... Y muchas gracias porque tú me diste el empujón que me hacía falta para cambiar a la tripanotión.

Anita, mil gracias por tu ayuda y tu trabajo al principio de este proyecto. Por sentarte conmigo delante del ordenador y explicarme cien veces si hacía falta, qué son esos “palitos de colores”. Por ser la peor jugadora de pádel de la historia y a la vez mi mejor compañera. Y por ser mi amiga en el exilio.

Kilian, gracias por todos los experimentos que has hecho para mí. Porque trajiste paz espiritual a nuestro laboratorio y por el “plátano bendecido por 10.000 niños lamas pequeñitos” que ojo, igual ha ayudado a que salga todo tan redondo.

Carlos y Andrés, gracias por ser muy buenos compañeros en el laboratorio y por los ratos divertidos que hemos pasado fuera, voy a acabar pensando que todos los colombianos son buena gente, me confiaré y un día ¡tan!, ¡corbata colombiana!



Gracias a toda la gente que ha estado y está en nuestro laboratorio: Carol, Iván, Marta, Ángel, Bea, Cristina, Irene, Gisela y Julia. A todos: lo siento si soy un pesado tocapelotas en el laboratorio con *como se tienen que hacer las cosas*.

Pablo, compañero, gracias por llegar en el momento justo. Andábamos muy escasos de testosterona y ya era hora de equilibrarlo. Somos la pareja paquete de los torneos de pádel, pero tú y yo sabemos que si no nos estamos jugando nada, ganamos a cualquiera. Gracias por ser como eres, no cambies nunca.

JB9, ¡crack!, muchas gracias por aguantar a un pesado como yo, que te pregunta la misma cosa del PyMOL 54 veces seguidas. Por ser mi compañero en todas las carreras y dejarme ganar siempre ;-). Por ser tan buena persona como eres.

Claire, gracias por ser tan maja a pesar de ser francesa (todos tenemos defectos) y por las galletitas corsas (¡algo bueno tenía que haber con que seas gabacha!). Antonio, eres el gallego más majito que me echado a la cara, qué pena que sólo te hayamos tenido con nosotros a temporadas.

Nadia, eres un pedazo de fichaje. Me da pena que no hayamos coincidido más en el tiempo. Cuida de Raúl y Ana, que habéis formado un laboratorio muy majito.

Chilo, gracias por tener tu puerta abierta siempre, figuradamente, para charlar y ayudar sobre cualquier problema, científico o no.

Gracias a todos los chicos y chicas de la planta de arriba: Lauralicia, Mali, Javi, Ariel, la tropa de Físio (Laura, Bea, Marta, Arantxa, Mercedes, Isa, Mati, Gema...). Y a toda la gente del Departamento de Bioquímica (Vero, Eva C., Eva G., Borja, Nuria, Diana, Ana, Sophie, Arantxa, Alberto...) porque siempre es agradable encontrarse una sonrisa en el pasillo cuando vas a por hielo.

Mil gracias a Guillermo Montoya, que me tuvo en su laboratorio como uno más durante 6 meses. Y a sus chicos, que forman parte de mi vida desde entonces. Jaska que es un sol de mujer capaz de traerme un favor desde Montenegro. Javi, gran consejero de Centro de Excelencia y mejor amigo. MaríaJo, una persona muy especial, que me enseñó que por muy negro que lo veas en la tesis, al final se hace la luz. Sonia, una mujer que es todo cariño y bondad para sus amigos. Berni, un crack, con unos chistes tan malos, que son buenos. June, una chica maravillosa. Bego, la dulzura personificada que rompió el hielo. Os quiero un montón a todos.

Isabel y todas las chicas que han ido pasando por la Unidad de Cultivos, Pilar de la Unidad de Biología Molecular, Juan y Guillermo de la Planta de Isótopos, Miguel y Luis de Bioquímica, gracias por la ayuda recibida cuando la he necesitado. Gracias a Antonio Romero, Elena Santillana y Carlos Alfonso por su ayuda con los experimentos de ultra analítica.

*Tack så mycket* Staffan, Gunnar, Elena, Lya, Rahma, Ashraf y Svetta. Qué paciencia tuvisteis con nosotros...

Milli, Noe, Celia y Carlos, gracias por aguantar y entender que la amistad está siempre ahí y que es más fuerte que las ausencias por trabajo. Por compartir las penas que os he contado y por vivir juntos tan buenos momentos, que han hecho más fácil y llevadero todo esto. Vendrán muchos más.

Joss, Hungri, Frías, Marín, Rubén, Javi, Arantxa, Laura, Merce, Fernando y Mario, gracias por ser muchas veces la bombona de oxígeno o el salvavidas que necesitaba para desconectar. Por las risas que hemos compartido y compartiremos.

Irene, gracias por ser como eres. Por aguantar mi mala leche, que es mucha, y pasarme la cantidad de capulladas que hago a lo largo del día. Por ser mi más fuerte apoyo durante los años que llevamos juntos. Te quiero.

Durante el periodo de realización de esta tesis pude disfrutar de una beca FPI de la Universidad de Alcalá. El trabajo para el desarrollo de dicha tesis pudo realizarse gracias a la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia para el proyecto de investigación *“Estrategias no convencionales para el desarrollo de profarmacos e inhibidores enzimáticos: la interfaz proteína-proteína como diana farmacológica. Modelado, cribado virtual y evaluación biológica”*

*A mi padre, a mi madre y a Raúl*

*A Irene*

*El que afirma que no se puede hacer no debe interrumpir al que lo está haciendo.*

(Refrán polaco)



## CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
Historia de la leishmaniasis.	8
Taxonomía del parásito <i>Leishmania</i> .	10
Epidemiología de la leishmaniasis.	12
Prevención de la leishmaniasis.	14
Tratamiento de la leishmaniasis.	15
Ciclo vital de <i>Leishmania</i> .	18
Respuesta inmune a la infección.	21
Regulación de la expresión génica.	22
Biología celular y metabolismo de <i>Leishmania</i> .	23
Control del estrés oxidativo en <i>Leishmania</i> .	25
<b>OBJETIVOS</b>	33
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	37
<b>RESULTADOS</b>	47
<b>1. Cribado de alto rendimiento de compuestos con posibilidades de ejercer un efecto leishmanicida.</b>	47
1.1 Infecciones de macrófagos con amastigotes de <i>L. infantum</i> .	47
1.2 Compuestos con selenio (Se).	48
1.3 Compuestos catiónicos derivados de los sistemas de azaquinilizinio y quinolizinio.	57

<b>2.</b>	<b>Inhibición de la dimerización de la TryR de <i>L. infantum</i>.</b>	<b>62</b>
2.1	Modelado por homología de la TryR de <i>L. infantum</i> .	62
2.2	Predicción de <i>hot-spots</i> de dimerización.	63
2.3	TryR silvestre y generación de mutantes de la TryR. Expresión y purificación.	67
2.4	Ensayo de actividad de TryR WT y mutantes W81A, E436A y Q439A.	69
2.5	Estudio cinético de las reacciones catalizadas por TryR WT y las mutantes W81A, E436A y Q439A.	71
2.6	Estudio del plegamiento y oligomerización de TryR WT, W81A, E436A y Q439A.	73
2.6.1	Estudio del plegamiento: dicroísmo circular.	74
2.6.2	Electroforesis de proteínas en condiciones nativas.	74
2.6.3	Ultracentrifugación analítica.	76
2.6.4	Ensayo de unión de FAD.	78
2.7	Profundización en el estudio de la dimerización de la TryR.	79
2.7.1	Generación de nuevas mutantes de TryR.	79
2.7.2	Caracterización enzimática de TryR E436K, C444S y E436A/C444S.	79
2.7.3	Estudio del plegamiento y oligomerización de TryR E436K, C444S y E436A/C444S.	81
2.8	Inhibición de la dimerización de la TryR.	84
2.8.1	Diseño de un inhibidor de la dimerización de la TryR.	84
2.8.2	Inhibición de la actividad de la TryR.	85
2.8.3	Inhibición de la dimerización de la TryR.	86

2.8.4	Efecto leishmanicida del péptido 3 en infecciones de macrófagos con amastigotes.	91
<b>DISCUSIÓN</b>		95
1.	<b>Cribado de alto rendimiento de compuestos con posibilidades de ejercer un efecto anti-<i>Leishmania</i>.</b>	96
1.1	Compuestos con Se.	96
1.2	Compuestos catiónicos derivados de los sistemas de azaquinilizinio y quinolizinio.	99
2.	<b>Inhibición de la dimerización de la TryR de <i>L. infantum</i>.</b>	101
2.1	<i>Hot-spots</i> de la dimerización.	101
2.2	Inhibición de la dimerización de la TryR como estrategia farmacológica.	104
2.3	La cisteína 444, ¿sensor biológico de estrés oxidativo en tripanosomátidos?	105
<b>CONCLUSIONES</b>		109
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>		113





## ABREVIATURAS

<b>1X PBS</b>	suero salino tamponado con fosfato	<b>k<sub>cat</sub></b>	número de recambio
<b>3'UTR</b>	región 3' no traducida	<b>K<sub>m</sub></b>	constante de Michaelis-Menten
<b>AB</b>	anfotericina B deoxicolato	<b>LB</b>	medio Luria Bertoni
<b>AB-L</b>	anfotericina B deoxicolato lipo-somal (AmBisome®)	<b>LC</b>	leishmaniasis cutánea
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>LCD</b>	leishmaniasis cutánea difusa
<b>ADNk</b>	ácido desoxirribonucleico kine-toplástico	<b>LMC</b>	leishmaniasis mucocutánea o espundia
<b>Ala o A</b>	alanina	<b>LV</b>	leishmaniasis visceral o kala-azar
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico	<b>Lys o K</b>	lisina
<b>ARN Pol II</b>	ARN polimerasa II	<b>MIL</b>	Miltefosina (Impavido®)
<b>ARNm</b>	ácido ribonucleico mensajero	<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>C444S</b>	tripanotión reductasa con la Cys444 mutada a Ser	<b>NK</b>	linfocitos asesinos naturales
<b>CMH</b>	complejo mayor de histocompatibilidad	<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>Cys o C</b>	cisteína	<b>NTD</b>	enfermedades tropicales olvidadas
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>DO</b>	densidad óptica	<b>OPD</b>	1,2-fenilenediamina
<b>DTNB</b>	ácido ditionitrobenzóico	<b>OvSH</b>	ovotiol A
<b>E436A</b>	tripanotión reductasa con el Glu436 mutado a Ala	<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>E436A/C444S</b>	E436A con la Cys444 mutada a Ser	<b>PM</b>	paromomicina
<b>E436K</b>	tripanotión reductasa con el Glu436 mutado a Lys	<b>PMA</b>	forbol 12-miristato 13-acetato
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminetetraacético	<b>Prx</b>	2-Cys-peroxirredoxina
<b>EGF</b>	factor de crecimiento epidérmico	<b>Px</b>	enzima de tipo glutatión-peroxidasa
<b>eGFP</b>	proteína fluorescente verde	<b>Q439A</b>	tripanotión reductasa con la Gln439 mutada a Ala
<b>ELISA</b>	ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas	<b>ROOH</b>	hidroperóxidos
<b>FAD</b>	flavín adenín dinucleótido	<b>ROS</b>	especies reactivas de oxígeno
<b>FTII B</b>	factor de transcripción II B	<b>RR</b>	ribonucleótido reductasa
<b>Gln o Q</b>	glutamina	<b>SASA</b>	superficie accesible al disolvente
<b>Glu o E</b>	glutámico	<b>Sb<sup>III</sup></b>	antimoniales trivalentes
<b>GR</b>	glutatión reductasa	<b>Sb<sup>V</sup></b>	antimoniales pentavalentes
<b>GSH</b>	glutatión reducido	<b>SDS</b>	dodecilsulfato de sodio
<b>Gsp</b>	mono-glutationilespermidina	<b>Ser o S</b>	serina
<b>GspS</b>	glutationil-espermidín sintetasa	<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>GSSG</b>	glutatión oxidado	<b>SH</b>	grupo tiol
<b>HEPES</b>	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazine-tanesulfónico	<b>SIDA</b>	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>IC<sub>50</sub></b>	inhibición del 50% del crecimiento	<b>T(SH)<sub>2</sub></b>	tripanotión reducido
<b>IL</b>	interleuquina	<b>TBST</b>	salino tamponado con fosfato y Tween-20 al 1%
<b>INF γ</b>	interferón γ	<b>Th</b>	linfocitos CD4+ T colaboradores
<b>IP</b>	ioduro de propidio	<b>TNB</b>	ácido 2-nitro-5-mercaptobenzóico
<b>IPTG</b>	isopropyl β-D-1-tiogalactopiranosido	<b>Trp o W</b>	triptófano
<b>IS</b>	índice de selectividad	<b>Trx</b>	tiorredoxina
		<b>TrxR</b>	tiorredoxina reductasa
		<b>TryR</b>	tripanotión reductasa
		<b>TryS</b>	tripanotión sintetasa
		<b>TS<sub>2</sub></b>	tripanotión oxidado

**Txn** triparredoxina  
**VIH** virus de la inmunodeficiencia humana  
**V<sub>max</sub>** velocidad máxima  
**W81A** tripanotión reductasa con el Trp81  
mutado a Ala  
**WT** silvestre

## ABSTRACT

Treatment of parasitic diseases caused by trypanosomatids requires the development of new agents endowed with both more selectivity and a pharmacological profile that is improved over that of currently used agents. We face this challenge by following two different strategies.

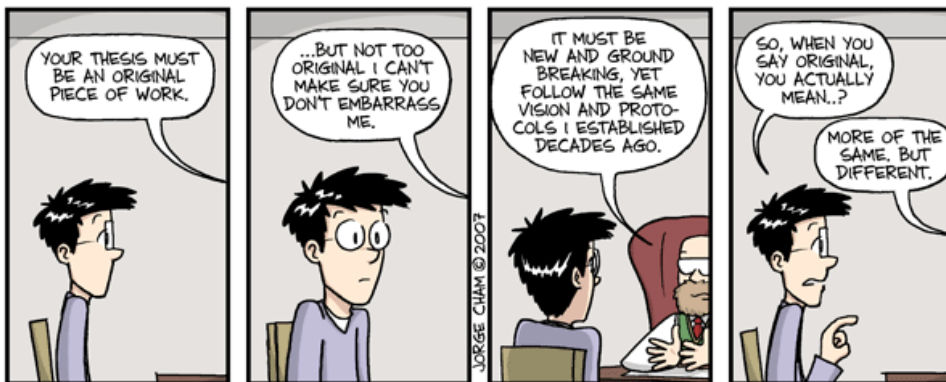
On the one hand, as new drugs are often discovered serendipitously by testing large chemical libraries, we decided to implement an in-house high-throughput screening (HTS) that will enable us to test cytotoxicity both on *Leishmania* promastigotes/amastigotes and two different human cell lines (Jurkat and THP-1). Using this HTS method we tested more than 160 compounds. The outcome in the treatment of amastigote-infected THP-1 cells was seven hits, four of them of comparable or even better activity than edelfosine, a reference standard antileishmanial drug. These derivatives thus represent new leads for further studies aimed at establishing their mechanism of action.

On the other hand, we pursued an innovative approach in the treatment of leishmaniasis consisting of inhibiting the dimerization of the enzyme trypanothione reductase (TryR), an essential homodimeric flavoenzyme unique to kinetoplastid parasites including *Trypanosoma*, responsible for Chagas disease and sleeping sickness, and *Leishmania*, responsible for cutaneous and visceral leishmaniasis. TryR is thought to be the central enzyme in the redox metabolism of these protozoans because it alone couples the transfer of reducing equivalents from the NADP<sup>+</sup>/NADPH pair to thiol-containing species.

By means of structure-based computational studies we found the hot-spots in the dimeric interface presumably responsible for the largest part of the intermolecular affinity. Using molecular biology, biochemistry and oligomerization detection techniques, we have found that glutamic 436 (E436), one of the three initial candidates identified as putative hot-spots, is a key residue for TryR dimerization. On the basis of these findings we then designed a peptide that inhibits both TryR dimerization and activity. Furthermore, we proved that this peptide has leishmanicidal activity on amastigote-infected human macrophages. We also present some results suggestive of the existence of a biological sensor in the trypanosomatids' TryR that allows them to detect an oxidative burst and react facing it.

To sum up, herein we show two different approaches aimed at fulfilling the need to develop new, efficient and safe drugs for the treatment of leishmaniasis.







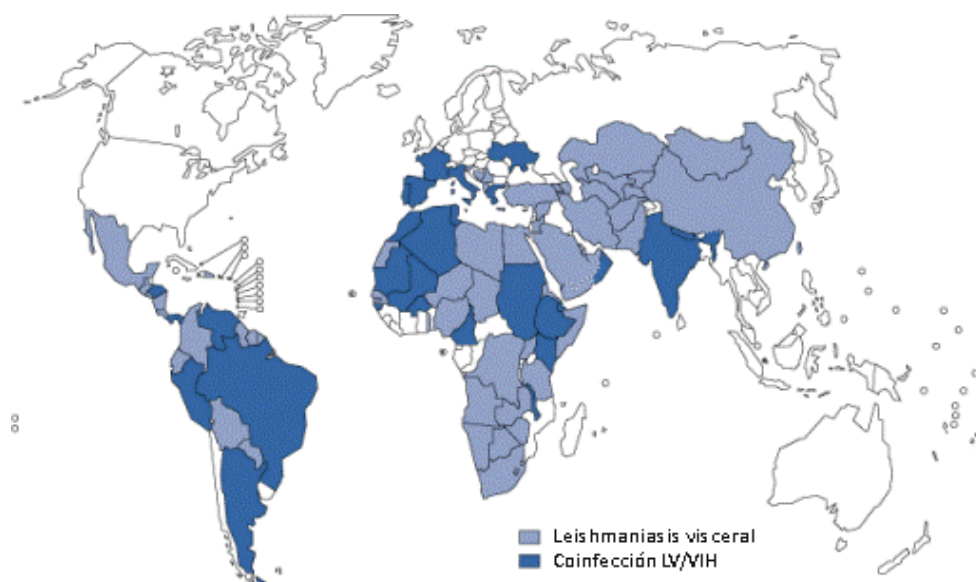
## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que se transmite por la picadura de dípteros de los géneros *Lutzomyia* y *Phlebotomus*. A día de hoy, hasta 350 millones de personas en 88 países diferentes están en riesgo de contraer la enfermedad. Se estima que hay 12 millones de infectados, con una tasa de 2 millones de nuevos casos de infección al año.

La leishmaniasis visceral (LV) es la forma más severa de esta enfermedad y ataca los órganos internos, principalmente hígado y bazo. Sin tratamiento, es fatal en un plazo máximo de dos años. La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma más común; produce úlceras en cara y extremidades y, aunque dichas úlceras pueden curarse espontáneamente, dejan severas cicatrices permanentes, asociándose a la LC situaciones de discriminación, estigmatización y condiciones de vida infrahumanas. Las epidemias son especialmente devastadoras en campos de refugiados.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud <sup>1</sup>, la co-infección de la LV y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se está convirtiendo en una siniestra tendencia global (fig. 1). En personas infectadas con VIH, la leishmaniasis acelera la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) por una inmunosupresión acumulativa, estimulando la replicación del virus. Así mismo y de forma complementaria, la propagación de la infección con el VIH, está provocando que la LV ya no se restrinja exclusivamente a zonas endémicas, cambiando la epidemiología de esta enfermedad. Las dos infecciones coexisten en una sinergia mortal. En el sur de Europa, por ejemplo, hasta un 70% de los casos de LV en individuos adultos están asociados con infección por VIH. En algunas zonas de Etiopía, el 35% de los enfermos de leishmaniasis están coinfectados con VIH y la tendencia se está expandiendo a los países vecinos como Sudán.





**Figura 1.** Distribución global de casos registrados de LV y co-infección de LV y VIH, 1990-1998 <sup>1</sup>.

Teniendo en cuenta la importancia de ambas enfermedades en Asia, África y Sudamérica, la propagación de la co-infección en estas zonas se antoja aterradora.

### **Historia de la leishmaniasis.**

La leishmaniasis es una enfermedad causada por distintas especies de *Leishmania* que presenta distintas manifestaciones en el Viejo y Nuevo Mundo.

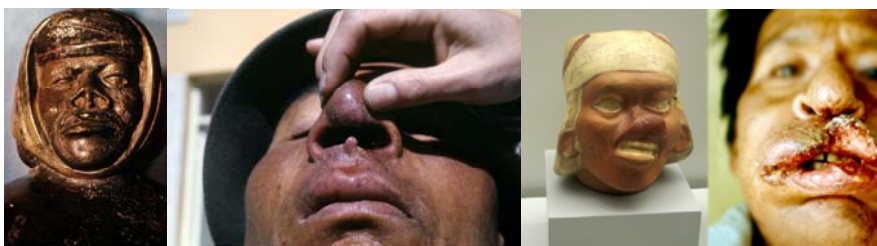
Desde un punto de vista histórico, es más sencillo considerar la forma del Viejo Mundo en primer lugar. La leishmaniasis cutánea (LC) del Viejo Mundo, conocida como “úlceras de Oriente”, es una enfermedad antigua, existiendo referencias a sus llamativas lesiones ya en el siglo VII a. C. en algunas losas de la biblioteca del rey Ashurbanipal (último rey del imperio Neo-Asirio) en Oriente Medio, aunque se piensa que algunos de estos escritos pueden hacer referencia a textos aún más antiguos, del 1500 al 2000 a. C. <sup>2</sup>. Hay detalladas descripciones de médicos árabes del siglo X d. C., como Avicena, sobre la úlcera oriental, conocida entonces y hoy en día como “úlceras de Balkh” en la zona norte del Afganistán actual <sup>3</sup>. Posteriormente se registraron casos de úlcera oriental en diferentes ciudades de la misma zona, como Bagdad o Jericó, dándosele nombres locales que perduran hoy en día. En 1756 Alexander Russel, examinando a un paciente turco a su cargo, realizó una de las primeras y más importantes descripciones clínicas de la enfermedad que en aquella zona se denominaba “furúnculo de Aleppo”: “Tras cerrarse, deja unas cicatrices

*desagradables y permanentes que permanecen con una tonalidad pálida durante varios meses. Mientras no están irritadas, raras veces producen dolor. Afecta a los nativos cuando son niños, apareciendo generalmente en la cara, aunque también presentan algunas lesiones en las extremidades. Es común que aparezca en los extranjeros algunos meses después de que lleguen a una zona endémica; muy pocos escapan sin lesiones, pero es muy raro que afecte al mismo individuo más de una vez”.*

La leishmaniasis visceral (LV) del Viejo Mundo también es conocida como “kala azar” terminología hindi para “fiebre negra”, caracterizada por la pérdida de tonalidad en la piel, fiebre e hinchazón del bazo que se da en la variante india de la enfermedad. Los primeros casos de “kala azar” fueron registrados en Jessore, India, en 1824, donde pacientes que se pensaba que sufrían fiebres debidas a la malaria, no respondieron al tratamiento con quinina; en 1862 la enfermedad se extendió a Burdwan donde alcanzó el grado de epidemia<sup>4</sup>, pensándose inicialmente que se trataba de una forma virulenta de malaria.

El descubrimiento del organismo responsable de la LC es un hecho controvertido, ya que distintos observadores describen distintas estructuras en úlceras orientales que podrían o no ser parásitos de *Leishmania*<sup>5</sup>. Generalmente se atribuye su descubrimiento a James Homer Wright<sup>6,7</sup> pese a que previamente el cirujano militar ruso P. F. Borovsky había publicado el mismo descubrimiento<sup>6,8</sup> si bien, al hacerlo en ruso, no había tenido suficiente difusión en el ámbito científico. Por otra parte, el parásito causante de la LV fue descubierto simultánea y paralelamente por los científicos William Leishman y Charles Donovan<sup>6,9</sup>, por lo que finalmente el parásito fue llamado *Leishmania donovani*. El género *Leishmania* había sido descubierto.

Al otro lado del océano, en el continente americano, tanto la LC como la leishmaniasis mucocutánea (LMC) producen malformaciones que pueden reconocerse en distintas piezas de cerámica pre-Inca que datan del siglo I d. C. y posteriores (fig. 2).



**Figura 2.** Dos ejemplos de cerámica pre-Inca con posibles lesiones producidas por leishmaniasis y pacientes con lesiones producidas por la variante mucocutánea de la enfermedad.

Textos del periodo Inca en torno a los siglos XV y XVI d. C. y también pertenecientes a la época de la colonización española, mencionan el riesgo que corrían los agricultores estacionales de la zona andina, de contraer la “enfermedad del valle” o “enfermedad andina”, que cursaba con úlceras cutáneas. Posteriormente, las malformaciones en boca y nariz de los enfermos hicieron que fuera conocida como “lepra blanca” <sup>10-12</sup>. Inicialmente se pensaba que las leishmaniasis del Viejo y el Nuevo Mundo eran la misma enfermedad, pero en 1911 Gaspar Vianna descubrió que los parásitos sudamericanos eran diferentes de los africanos e indios, creando una nueva especie, la *L. braziliensis* <sup>13</sup>. Desde entonces se han descubierto más especies exclusivas del continente americano.

Hasta 1921 <sup>14</sup> no se descubrió el vector involucrado en la transmisión de la enfermedad, los flebótomos o Phlebotominae, una subfamilia de dípteros nematóceros de la familia Psychodidae, siendo el género *Phlebotomus* el responsable de la transmisión en el Viejo Mundo y el género *Lutzomyia* en el Nuevo. El actual modelo de infección, a través de la picadura del flebotomo, no fue finalmente demostrado hasta 1941 por Adler y Ber <sup>15</sup>.

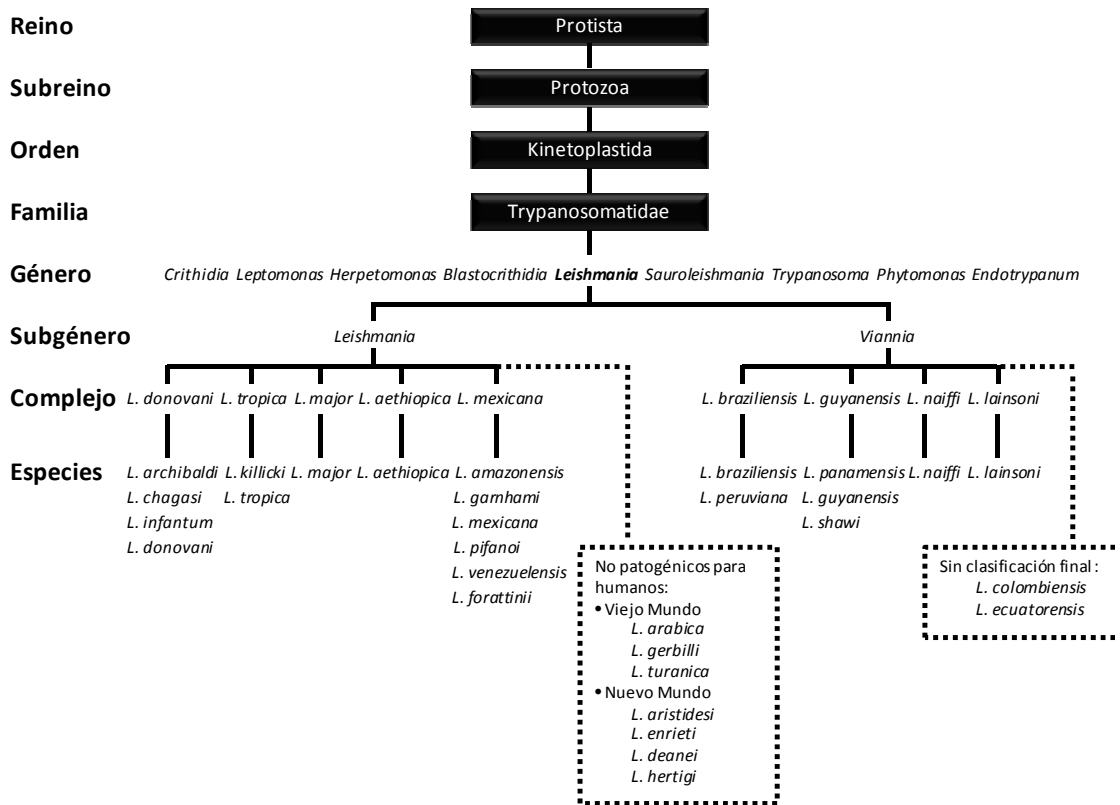
#### **Taxonomía del parásito *Leishmania*.**

Inicialmente la clasificación del parásito *Leishmania* se basó en criterios ecobiológicos tales como vectores, distribución geográfica, tropismo, propiedades antigénicas y manifestación clínica <sup>16-19</sup>. Sin embargo, análisis bioquímicos y moleculares han demostrado que criterios geográficos y patológicos no son los más adecuados, por lo que posteriormente se han utilizado otros para realizar dicha clasificación, como por ejemplo los patrones de polimorfismo de los marcadores de ácido desoxirribonucleico kinetoplástico (ADNk), proteínas o antígenos <sup>18, 20-31</sup>.

Todos los miembros del género *Leishmania* son parásitos de mamíferos. Los dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, están separados en base a su localización en el intestino del vector <sup>19</sup>. Posteriormente se utilizaría el análisis de isoenzimas para determinar los complejos de especies de cada subgénero <sup>32</sup>.

Inicialmente, la clasificación de las especies se basó en distintos criterios extrínsecos, como características biológicas, geográficas y clínicas; por ejemplo, *L. guyanensis* (aislada en Guayana), *L. peruviana* (aislada en Perú), *L. infantum* (aislada de un niño en Túnez) y *L. gerbilis* (aislada de un gerbo). Desde los años setenta, se ha pasado a utilizar criterios intrínsecos para definir las especies de *Leishmania* basados en datos genéticos, bioquímicos e inmunológicos. La utilización de estas técnicas moleculares

condujo a que la OMS publicara un esquema taxonómico actualizado<sup>33</sup>. La aparición de nuevos métodos de detección, aislamiento e identificación genética condujo a un incremento sustancial en el número de especies descritas. Hoy en día se conocen 30 especies, siendo 20 de ellas patogénicas para el hombre (fig. 3).



**Figura 3.** Taxonomía de *Leishmania* (adaptado de Bañuls AL *et al*, 2007<sup>34</sup>, basado en el esquema publicado por la OMS en 1990<sup>33</sup> con adiciones de la literatura).

Generalmente, estas especies presentan diferentes características clínicas y epidemiológicas, en función de los distintos perfiles genéticos y fenotípicos. La validez de este esquema de clasificación, considerada por algunos investigadores como demasiado arbitraria, ha sido cuestionada varias veces. El debate se ha centrado en *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. archibaldi*, *L. garnhami*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis* and *L. forattinii*<sup>35-39</sup>. Diferentes estudios han clarificado el estatus de alguna de estas especies; por ejemplo, *L. chagasi* es aceptado como sinónimo de *L.*

*infantum*<sup>37</sup> y *L. peruviana* ha sido validada como una especie independiente<sup>36</sup>. El resto de especies mencionadas están todavía en discusión.

### Epidemiología de la leishmaniasis.

La leishmaniasis humana consiste en un espectro de enfermedades que se dividen en cuatro grupos<sup>40</sup>:

Leishmaniasis	Cuadro clínico	Paciente
LC: Cutánea (úlceras de Oriente)	Lesiones en la piel de cara y extremidades. Aunque a menudo se resuelve por sí misma, puede dejar graves secuelas y cicatrices permanentes. Tras la completa recuperación la LC confiere inmunidad a la reinfección por la misma especie de <i>Leishmania</i> que la originó.	
LCD: Cutánea difusa	Lesiones diseminadas parecidas a las producidas por la lepra que no se curan espontáneamente. Esta variedad está especialmente ligada a un sistema inmune deficiente y son frecuentes las recaídas post-tratamiento.	
LMC: Mucocutánea (espundia)	Lesiones que desfiguran la cara: destruye las membranas mucosas de nariz, boca y garganta. La cirugía estética de las desfiguraciones es una parte muy importante de la terapia.	
LV: Visceral (kala-azar)	Fiebre irregular, pérdida de peso, hinchazón de bazo e hígado y anemia. La forma más severa de la enfermedad y normalmente mortal si no se trata. El periodo de incubación puede ser de meses o años y, a diferencia de las formas cutáneas, afecta a los órganos internos. Tras el tratamiento y recuperación, los pacientes pueden desarrollar LC crónica, la cual requiere un tratamiento largo y caro.	

**Figura 5.** Distintos tipos de leishmaniasis humanas y su sintomatología.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependerán de la especie involucrada, aunque una misma especie puede generar diferentes síntomas y respuesta a las terapias.

El área de distribución de las distintas formas de leishmaniasis se puede subdividir en “Nuevo Mundo” (las Américas) y “Viejo Mundo” (África, Asia y Europa). Todas las especies del subgénero *Viannia* fueron aisladas en el Nuevo Mundo, mientras que


todas las del *Leishmania* se aislaron en el Viejo Mundo, excepto *L. hertigi* y *L. deanei* del complejo *L. Mexicana* que fueron aisladas en las Américas y *L. infantum/chagasi* y *L. major* que son encontradas en ambas zonas del globo.

El insecto vector de la leishmaniasis, el flebotomo, se encuentra en todas las zonas intertropicales del planeta. Desconocida en gran medida en el mundo desarrollado, esta enfermedad es endémica en 88 países y más de 350 millones de personas están en riesgo de contraerla. Durante los últimos 10 años y, posiblemente, como consecuencia del cambio climático, las regiones endémicas se han ido extendiendo. De los 88, 72 son países en vías de desarrollo:

1. El 90% de los casos de LV se dan Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán.
2. El 90% de los casos de LMC ocurren en Bolivia, Brasil y Perú.
3. El 90% de los casos de LC acontecen en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria.

Debido a que la inmensa mayoría de la población en riesgo vive en la pobreza, esta enfermedad suscita muy poco o ningún interés comercial para las compañías farmacéuticas. Al igual que ocurre con muchas de las enfermedades que se ceban en los estratos más pobres de la sociedad y que provocan alta morbilidad, pero poca mortalidad, el verdadero alcance de la leishmaniasis permanece oculto, en parte porque muchos de los enfermos viven en zonas remotas y en parte por la discriminación social asociada a las cicatrices y desfiguraciones causadas por esta enfermedad. Las minusvalías asociadas a la leishmaniasis conllevan una gran tara social, especialmente para las mujeres y afectan a la productividad económica. En numerosas ocasiones las epidemias han retrasado significativamente la implementación de proyectos de desarrollo, por lo que se ha convertido en una enfermedad que impide el desarrollo socioeconómico.

La LV puede producir epidemias a gran escala, con altas tasas de mortalidad. Se sabe que la malnutrición es un factor de riesgo a la hora de desarrollar esta forma y las epidemias se extienden en situaciones de hambruna, emergencias complejas y grandes movimientos de población. En Sudán, por ejemplo, entre los años 1984 y 1994 se produjo una enorme epidemia. Al ser la primera de la zona, la población era altamente susceptible. Se estima que causó del orden de 100.000 muertes en una población de 300.000 individuos en la zona noroeste del país vecina al Nilo. En 1997, el número de casos de LV en Sudán se disparó con un aumento del 400% respecto al año anterior. Los centros de tratamiento fueron completamente superados por la



demanda, agotando las reservas de los fármacos de primera elección. La migración de los trabajadores estacionales y los grandes movimientos de la población originados por los disturbios civiles llevaron la epidemia a Eritrea y Etiopía, donde la OMS anunció emergencias similares en 1998.

Brasil ha experimentado también un repentino aumento en el número de casos de LV desde 1999. La enfermedad está apareciendo en una forma urbana, mientras la forma rural se mantiene. Olas de sequía, falta de tierras cultivables y hambruna han producido grandes migraciones de las zonas rurales a la periferia de las grandes ciudades, creando asentamientos muy masificados, con una infraestructura mínima y condiciones muy poco salubres. Así, se introduce un parásito nuevo en una zona con un gran número de potenciales huéspedes no inmunes, entre los que campa la malnutrición. Los perros que se mantienen en el entorno doméstico constituyen el principal reservorio y los niños menores de 15 años son el grupo de mayor riesgo.

Aunque lejos de ser letales, las epidemias de LC son un gran problema en Afganistán, donde décadas de guerra y disturbios han servido de caldo de cultivo para la propagación de la enfermedad. Ésta ha rebrotado en 2002, con alrededor de 100.000 casos en la capital, Kabul, en gran medida por el retorno de refugiados con bajos niveles de resistencia a la enfermedad. El personal internacional que trabaja en Afganistán también afronta un gran riesgo. La OMS, en colaboración con el gobierno de Afganistán y varias organizaciones no gubernamentales, han tomado medidas de emergencia para contener la epidemia.

#### **Prevención de la leishmaniasis.**

Aunque hay modelos animales en los que la vacunación induce una inmunidad frente a la enfermedad, a día de hoy no hay vacunas para humanos <sup>41</sup>, por lo que la prevención depende exclusivamente del control de vector y de los reservorios.

En lo referente al control del flebotomo y en vista del poco éxito de las campañas de fumigación de los hogares, se han realizado distintos ensayos en áreas de LC endémica en Siria, introduciendo mosquiteras para cama impregnadas con insecticida, que han reducido drásticamente la transmisión de la LC, con una disminución en la aparición de nuevos casos de hasta el 95% <sup>42</sup>.

## Tratamiento de la leishmaniasis.

El arsenal farmacológico disponible para el tratamiento de la leishmaniasis es limitado y la situación no hace sino empeorar ya que, debido a la falta de supervisión en los tratamientos de los enfermos en las zonas de transmisión antroponótica, durante las últimas décadas se vienen desarrollando resistencias a las distintas quimioterapias. A día de hoy, existen siete tipos de fármacos en distintas fases de aplicación para combatir esta enfermedad:

### 1. Antimoniales pentavalentes ( $Sb^V$ ).

La primera opción para el tratamiento de la leishmaniasis (*first-line treatment*) son preparaciones de antimonio pentavalente como el Pentostam® (estibogluconato de sodio) y el Glucantime® (meglumina antimoniató). Se administran por vía parenteral durante un periodo de 10 a 30 días y el coste total del tratamiento oscila entre los 50 y 200 dólares americanos por enfermo. Estos compuestos son efectivos, pero bastante tóxicos atendiendo a la relación eficacia/cantidad de  $Sb^V$  administrado, dañando el corazón del enfermo hasta el punto de alcanzar una mortalidad del 3-6%. Al problema de la toxicidad hay que añadir el hecho de que distintas especies de *Leishmania* han desarrollado resistencias a estos fármacos en diversas zonas de Viejo y Nuevo mundo a lo largo de los últimos 20 años<sup>43</sup>, por lo que se dan recaídas en el 10-25% de los casos de todas las formas de leishmaniasis.

Durante los 60 años de utilización de estos fármacos, no se ha elucidado su mecanismo de acción, si bien se sabe que realmente son profármacos, que requieren de su reducción a la forma trivalente ( $Sb^{III}$ ) para activarse<sup>44</sup>. Se sabe que los antimoniales trivalentes inhiben la tripanotión reductasa (TryR) y que la reducción de la TryR por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) es esencial para esta inhibición<sup>45</sup>. In vivo, los antimoniales interfieren en el metabolismo del tripanotión  $[T(SH)_2]$ , induciendo un rápido flujo del  $T(SH)_2$  y glutatión (GSH) intracelular hacia el exterior del parásito. Por otra parte, al inhibir la TryR favorecen la acumulación de la forma oxidada del tripanotión ( $TS_2$ ) y glutatión (GSSG) dentro del tripanosomátido<sup>46</sup>. La reciente cristalización de la TryR de *L. infantum* en su forma oxidada y del complejo formado por la TryR en su forma reducida junto a la NADPH y  $Sb^{III}$ <sup>47</sup> ha sentado las bases moleculares del mecanismo de acción de los antimoniales por inhibición de la actividad de la TryR, sin que ello signifique que no puedan existir -y probablemente existan- otras dianas para el fármaco.



## 2. Pentamidina.

Es uno de los fármacos utilizados como segunda opción si los antimoniales no resultan efectivos y que se comercializa como lomidine®. Utilizado desde 1940, su mecanismo de acción no es del todo claro. Parece ser que actúa inhibiendo la biosíntesis de poliaminas, se une al surco menor del ADN y afecta al potencial de membrana mitocondrial<sup>48-50</sup>.

## 3. Anfotericina B deoxicolato (AB).

Es otro de los fármacos utilizado como segunda línea, conocido comercialmente como Fungizone®. Se trata de un polieno antibiótico y fungicida que se utiliza contra la leishmaniasis desde 1959. Se piensa que interactúa con los esteroides de membrana y que su selectividad radica en la mayor afinidad del fármaco por el ergosterol presente en la membrana plasmática de *Leishmania*, frente a la que tiene por el colesterol de las membranas de las células del mamífero anfitrión. Al agregarse y formar canales en la membrana del parásito provoca la pérdida iones y solutos intracelulares. Sus peligrosos efectos secundarios (miocarditis y disfunción renal) requieren la hospitalización del paciente durante un mes y monitorización de la función renal. AmBisome® es la formulación liposomal de AB (AB-L) que se empezó a utilizar en 1994 y que, si bien permite dirigir el fármaco hacia los parásitos<sup>51, 52</sup>, aumenta la vida media del fármaco y, por consiguiente, la posibilidad de aparición de resistencias al mismo. Al presentar una toxicidad mucho más moderada, permite tratamientos endovenosos a altas concentraciones en una sola semana; a pesar de una reducción del 90% de su coste (20 dólares por vial de 50 mg), el tratamiento medio de 20 mg/kg dosis total sigue costando 300 dólares y este fármaco necesita que se mantenga la cadena del frío durante su transporte y almacenamiento.

## 4. Miltefosina (MIL).

En el año 2002 se aprobó un nuevo fármaco de primera opción para tratar la leishmaniasis visceral en la India, la hexadecilfosfolina o miltefosina, comercializada bajo el nombre de Impavido®<sup>53</sup>. Este lisofosfolípido utilizado originalmente para tratar algunos tipos de cáncer, interfiere en la síntesis de fosfolípidos y esteroides de *Leishmania*<sup>54, 55</sup>. Su gran ventaja radica en que es el primero que puede ser administrado oralmente y resulta muy efectivo (tasa de curación del 95% de LV), aunque debe ser administrado por un periodo de 28 días<sup>56, 57</sup>. Distintos estudios en Etiopía y Colombia han mostrado que también es

efectiva en África y frente a la LC. Tiene buena tolerancia, pero se debe tener en cuenta su potencial teratogenicidad, por lo que no puede ser administrado a mujeres en edad fértil que no sigan un programa de contracepción. Desgraciadamente ya se han dado casos de cepas resistentes a este fármaco en algunos laboratorios<sup>58</sup>.

#### 5. Paromomicina (PM).

Se trata de un antibiótico aminoglicósido que se presenta como una alternativa eficaz, segura y muy económica (10 dólares) pero que requiere 21 inyecciones intramusculares. Hasta el momento se ha utilizado en ensayos clínicos de fase III con administración parenteral para el tratamiento de la LV y con uso tópico y administración parenteral para la LC. Se han observado pequeños signos subclínicos de ototoxicidad y nefrotoxicidad. Sin embargo, hay algunas cepas de *Leishmania* en algunas zonas de África que se han mostrado resistentes a este fármaco

#### 6. Azoles.

Se trata de unos fungicidas que se han utilizado en algunos ensayos clínicos. Se piensa que afectan la ruta biosintética del ergosterol al inhibir el citocromo P450. En el caso concreto del tratamiento de la leishmaniasis, destacan el ketoconazol, el itraconazol y el fluconazol. El inconveniente reside en que los amastigotes de *Leishmania* son capaces de suplir la falta de ergosterol con colesterol, disminuyendo drásticamente la efectividad de estos fármacos<sup>59</sup>.

#### 7. Sitamaquina.

Anteriormente conocida como WR6026, la sitamaquina es un derivado de la 8-aminoquinolina con un amplio espectro de actividad anti-protocítica<sup>60</sup> que puede administrarse oralmente y que se está empleando en ensayos clínicos en fase III que sugieren actividad, aunque no se descarta la nefrotoxicidad. Poco se sabe de su mecanismo de acción. Si bien se sabe que se acumula en los acidocalcisomas de los parásitos, se descarta que la sensibilidad de los mismos al fármaco dependa de este fenómeno<sup>61</sup>.

#### 8. Alopurinol.

Fármaco que se utiliza en el tratamiento de la gota. Se piensa que puede inhibir la síntesis proteica de los parásitos. Si bien al utilizarse en la leishmaniasis

humana los resultados no han sido muy esperanzadores, es el fármaco estándar con el que se trata la leishmaniasis en perros.

La terapia combinada con los fármacos disponibles es el futuro inmediato para retrasar el desarrollo de resistencias, aumentar la actividad antiparasitaria y disminuir la dosis y duración del tratamiento, con el consiguiente beneficio para el enfermo y la reducción del coste indirecto de la enfermedad. Distintos ensayos médicos se están desarrollando actualmente para determinar la combinación más adecuada.

A más largo plazo, la necesidad de nuevos y mejores fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis es evidente, ya que la mayor parte de los existentes son caros, requieren largos periodos de tratamiento y se van haciendo cada vez menos efectivos. Para la OMS el panorama es desolador ya que no se espera la aparición de ningún fármaco nuevo durante los próximos 10 años. No podemos cejar en la búsqueda de un compuesto efectivo, de baja citotoxicidad, estable y barato para el tratamiento de esta enfermedad.

### **Ciclo vital de *Leishmania*.**

*Leishmania* presenta un ciclo de vida complejo durante el cual los parásitos están expuestos a diferentes entornos intra y extracelulares. Estos organismos son parásitos digenéticos con dos etapas principales en su ciclo vital: una etapa extracelular dentro de un huésped invertebrado (flebotomo) y una intracelular dentro del huésped vertebrado. De acuerdo con los distintos entornos, los parásitos presentan principalmente dos morfologías, amastigote y promastigote, que se encuentran en el huésped vertebrado e invertebrado respectivamente.

#### **1. Etapas en el huésped invertebrado.**

Las hembras de los flebotomos son hematófagas, ya que la sangre es necesaria para obtener las proteínas necesarias para fabricar huevos. De los seis géneros de flebotomo que se conocen, sólo dos tienen importancia médica: *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (dividido en 12 subgéneros) y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (dividido en 25 subgéneros). Todos los vectores de la leishmaniasis conocidos pertenecen a estos dos géneros. De entre las 500 especies de flebotomos existentes, sólo 31 han sido identificadas como vectores de especies patogénicas de *Leishmania* y 43 como posibles vectores<sup>62, 63</sup>. La especie de flebotomo implicada en la transmisión de *Leishmania* varía en función de la región geográfica y de la especie de *Leishmania*<sup>62, 63</sup>.

Dentro del vector, *Leishmania* se desarrolla en las formas infectivas conocidas como promastigotes, etapas extracelulares en las que el parásito adquiere una forma alargada (5-20  $\mu\text{m}$  x 1-4  $\mu\text{m}$ ) y motilidad propia gracias a un flagelo de unos 20  $\mu\text{m}$  de longitud. Durante esta etapa la forma del promastigote varía ligeramente en función del tiempo de permanencia en el sistema digestivo del insecto, comenzando como promastigotes procíclicos (presentes en la ingesta de sangre) que se diferencian a promastigotes nectomónados que a su vez migran de la parte posterior del intestino a la anterior para diferenciarse a leptomónados, precursores de los promastigotes metacíclicos, la forma infectiva para el mamífero<sup>64</sup>.

## 2. Etapas en el huésped vertebrado.

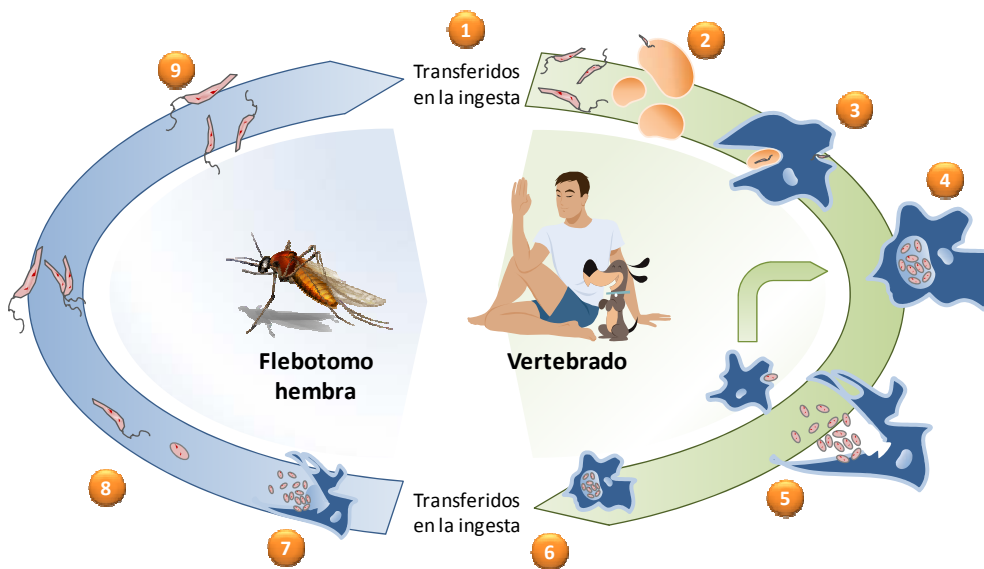
Uno de los mayores logros de los parásitos del género *Leishmania* es que son capaces de parasitar las células de mamífero responsables de destruir a los organismos invasores: los macrófagos<sup>65</sup>. Estos parásitos son tremendamente exitosos, por lo que se encuentran infecciones naturales en muchos órdenes de mamíferos<sup>19</sup>: roedores, cánidos, xenartros (hormigueros, perezosos, armadillos), marsupiales, mapaches, ungulados y primates. Todos estos mamíferos son potenciales reservorios de la enfermedad (ciclo zoonótico). Los humanos son considerados en la mayoría de los casos como huéspedes accidentales ya que una especie de *Leishmania* se adapta más fácilmente a un huésped reservorio en el que el insecto vector se alimenta regularmente<sup>65</sup>. Aunque los humanos son susceptibles a la infección por especies de *Leishmania* cuyos huéspedes naturales van desde los xenartros hasta los roedores<sup>66</sup>, nuestra especie no es picada regularmente por el vector, por lo que sólo en algunas zonas como Sudán se dan casos de reservorios humanos conformando un ciclo antroponótico<sup>67</sup>.

En el huésped vertebrado los parásitos se diferencian a la forma amastigote. Éstos son ovoides (2.5 – 5  $\mu\text{m}$  de diámetro), carecen de flagelo externo y, por tanto, de motilidad. Se encuentran en las vacuolas parasitóforas de los macrófagos del huésped.

## 3. Ciclo vital.

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando una hembra de flebotomo infectada pica a un huésped vertebrado (fig. 4-1). Al mismo tiempo que el flebotomo se alimenta de la sangre, las formas infectivas de promastigote (promastigotes metacíclicos) entran en el huésped vertebrado a través de la

trompa. Tradicionalmente se ha considerado que, una vez introducidos en el huésped, los promastigotes son fagocitados directamente por los macrófagos (fig. 4-3). Sin embargo, publicaciones recientes sugieren que los promastigotes podrían ser inicialmente fagocitados por los neutrófilos (fig. 4-2) y éstos a su vez fagocitados por los macrófagos (actuando los primeros a modo de caballo de Troya)<sup>68-71</sup>. Una vez en el interior de los macrófagos los parásitos se transforman en amastigotes que comienzan a dividirse por fisión binaria acumulándose en el fagolisosoma (fig. 4-4). Aumentan su número hasta que finalmente revientan la célula, liberándose e infectando a los macrófagos vecinos (fig. 4-5). El ciclo se completa cuando un flebotomo se infecta al alimentarse de la sangre de un huésped infectado (fig. 4-6). Los amastigotes liberados en el intestino del flebotomo (fig. 4-7) se transforman en promastigotes procíclicos (fig. 4-8), se multiplican por división simple y migran a la faringe y la trompa, donde finalmente se diferencian a promastigotes metacíclicos (fig. 4-9).



**Figura 4.** Ciclo vital de *Leishmania*, parásito digenético con etapas en el huésped invertebrado o vector (flebotomo) y etapas en el huésped vertebrado.

El hecho de que *Leishmania* sea capaz de multiplicarse en dos entornos tan distintos, nos da una idea de su increíble capacidad de adaptación.

## Respuesta inmune a la infección.

Como ya hemos mencionado, paradójicamente, *Leishmania* se sirve de células de sistema inmune para infectar al huésped vertebrado y continuar su ciclo vital. Para ello, los parásitos tienen que ser capaces de inhibir la activación de una respuesta inmune efectiva. Dado que muchos individuos infectados permanecen asintomáticos<sup>72-75</sup>, es obvio que una correcta respuesta inmune del ser humano puede eliminar o mantener bajo control a los parásitos. Los macrófagos son las células del huésped parasitadas por *Leishmania*. Son células clave en el sistema inmune del huésped<sup>76</sup> ya que, junto con las dendríticas, son las encargadas de presentar los antígenos del parásito a los receptores de las células T vía las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)<sup>77, 78</sup> dentro del contexto de lo que se conoce como respuesta inmune adquirida. Este paso es clave ya que, en función del tipo de citoquinas secretadas y de los péptidos que sean presentados, el huésped desarrollará uno u otro tipo de respuesta inmune<sup>79-81</sup>. El resultado de la infección dependerá de si el huésped organiza en primer lugar una respuesta inmune de linfocitos CD4+ T colaboradores (Th) de tipo 1 o una respuesta inmune Th de tipo 2<sup>82</sup>. Aunque el papel de las células CD4+ Th1 y Th2 y de las citoquinas que producen no está completamente esclarecido en humanos, en modelos animales se ha demostrado que la respuesta Th1 va asociada a la resistencia y resolución de la enfermedad, mientras que la respuesta Th2 se asocia a su susceptibilidad y progresión<sup>83</sup>. Otros estudios en animales han demostrado que los Th1 y los linfocitos asesinos naturales (*natural killers* o NK) producen interferón  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ), encargado de mediar en la resistencia, mientras que los Th2 producen interleuquina (IL) 4, provocando susceptibilidad a la infección<sup>84</sup>. Estudios en seres humanos han demostrado también que la IL4 podría estar asociada con el desarrollo de la enfermedad<sup>85</sup>.

Con el fin de tener éxito en la infección, *Leishmania* ha desarrollado distintas estrategias para manipular el funcionamiento de los macrófagos. De este modo, los parásitos disponen de mecanismos para evadir o interferir los procesos de presentación de antígenos, haciendo posible resistir parcialmente las respuestas inmunes mediadas por las células T<sup>86</sup>.

Estas estrategias de escape parecen variadas y complejas, dado que en el ser humano se observan distintos patrones de respuesta inmunológica en función de la manifestación clínica y la exposición a diferentes especies de *Leishmania*. De forma muy resumida, es posible afirmar que:

1. Se observan distintas repuestas de las células T entre las distintas formas de LC: una ausencia de repuesta Th1 (más que una presencia de repuesta Th2) en LCD; una repuesta Th1 en pacientes con lesiones autorresolutivas<sup>87-89</sup> y una repuesta mezcla de Th1 y Th2 con altos niveles de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en pacientes con LMC<sup>90-93</sup>.
2. En los casos de LV, se observa una mezcla de repuestas Th1 y Th2 junto a una producción de IFN- $\gamma$  e interleuquina (IL)-10<sup>94, 95</sup>. Sin embargo, los individuos asintomáticos o con infecciones subclínicas de LV muestran proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) junto a producción de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10. En pacientes completamente recuperados se han aislado clones de Th1 y Th2 que producen IFN- $\gamma$  e IL-4 en respuesta a la exposición a antígenos del parásito<sup>96</sup>.

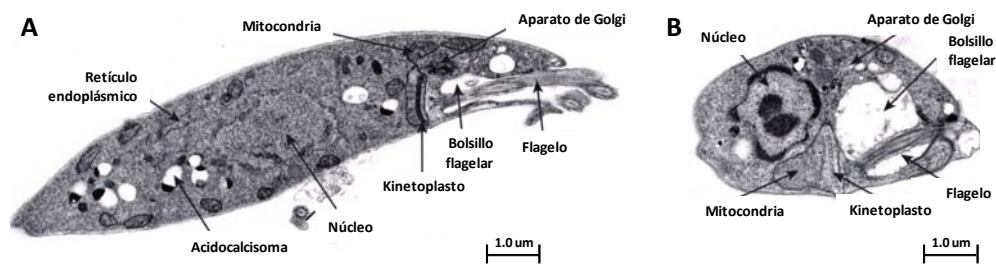
### **Regulación de la expresión génica.**

Todos los organismos se adaptan a los cambios en su entorno por ajustes en su expresión génica y, en todos los organismos, desde *Escherichia coli* al hombre, el punto de control más importante es la iniciación de la transcripción. Sorprendentemente, las especies pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, comúnmente conocidas como tripanosomátidos y a la que pertenece *Leishmania*, son una clara excepción ya que parecen haber perdido casi por completo la capacidad de regular la transcripción mediante la ARN polimerasa II (ARN Pol II), no habiéndose encontrado promotores canónicos para los genes codificantes de proteínas<sup>97-99</sup>. Además, en los tripanosomátidos, factores de transcripción típicos como la proteína de unión a TATA o el factor de transcripción II B (FTII B) son muy diferentes a los habituales en eucariotas. La relativamente reciente secuenciación del genoma completo de *L. major*<sup>100</sup>, *L. infantum* y *L. braziliensis*<sup>101</sup> indica que los genes codificantes de proteínas están generalmente organizados en grandes unidades policistrónicas. La regulación génica de estos organismos se produce exclusivamente a un nivel post-transcripcional y puede incluir procesamiento pre-ARN mensajero (pre-ARNm), estabilidad del ARNm, traducción, estabilidad proteica y control post-traducciona<sup>102</sup>. Además, se han encontrado muchas proteínas de unión al ARN codificadas en el genoma de *Leishmania*<sup>100</sup>, lo que parece consecuente con una activa regulación post-transcripcional de la expresión génica. A día de hoy, se han identificado varios genes específicos de cada estado morfológico de *Leishmania* (promastigote y amastigote); sin embargo, los mecanismos moleculares encargados de la regulación génica del desarrollo de estos parásitos no están completamente

elucidados. En líneas generales, secuencias dentro de la región 3' no traducida (3'UTR) que actúan post-transcripcionalmente, han demostrado jugar un papel fundamental en la regulación de transcritos expresados de forma diferencial en *Leishmania*<sup>103-112</sup>. Los mecanismos de regulación post-transcripcional asociados con estas secuencias 3'UTR están basados en la regulación de la estabilidad de los ARNm y en la eficiencia con la que dichos mensajeros son traducidos.

### Biología celular y metabolismo de *Leishmania*.

*Leishmania* es un parásito con un ciclo de vida complejo en el que pueden observarse dos morfologías: la del promastigote dentro del vector y la del amastigote dentro de los macrófagos del huésped vertebrado (fig. 5).




**Figura 5.** Ultraestructura de secciones longitudinales de promastigote (A) y amastigote (B) de *Leishmania* mostrando la estructura polarizada de la célula. Además se aprecian el flagelo y bolsillo flagelar, el cinetoplasto, la mitocondria, el núcleo, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi<sup>113</sup>.

Las condiciones ambientales (temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, etc.) que encuentra el parásito difieren de forma significativa entre el intestino del flebótomo y el interior de los fagolisosomas del macrófago, lo que exige cambios en la biología y el metabolismo del parásito.

Los promastigotes son alargados y poseen un flagelo que surge a partir del bolsillo flagelar. Los amastigotes son ovoides y tienen el flagelo invaginado, prácticamente oculto, dentro de dicho bolsillo. El núcleo de *Leishmania*, tanto en los promastigotes como en los amastigotes, se encuentra rodeado por el retículo endoplásmico. En el centro del núcleo se puede observar un prominente nucléolo de un diámetro aproximado de 1 µm. Al igual que otros parásitos de la familia Trypanosomatidae, los promastigotes y amastigotes de *Leishmania* tienen una sola mitocondria que se extiende a lo largo de todo el cuerpo del parásito. Dentro de la mitocondria, en una





región localizada cercana al cuerpo basal del flagelo se encuentra una estructura denominada kinetoplasto que posee cerca del 15% del ADN celular y que constituye el genoma mitocondrial. Así mismo, el parásito dispone de unos compartimentos para el almacenamiento de calcio, los acidocalcisomas, ricos igualmente en pirofosfatos, magnesio, sodio y zinc. Además de servir como lugar de almacenamiento y liberación de grandes cantidades de calcio importantes para la señalización celular, se piensa que los acidocalcisomas son también importantes en la homeostasis del pH y la regulación osmótica del parásito <sup>114-116</sup>.

Los estudios experimentales del metabolismo de *Leishmania* se han centrado en los promastigotes del intestino medio del flebotomo, ya que estos son más fáciles de mantener en cultivo. El estudio del metabolismo de la etapa patogénica, el amastigote, ha resultado mucho más complicado por la presencia de la célula hospedadora y porque no ha sido hasta hace relativamente pocos años que se ha logrado la reproducción experimental de las condiciones del fagolisosoma para obtener amastigotes axénicos.

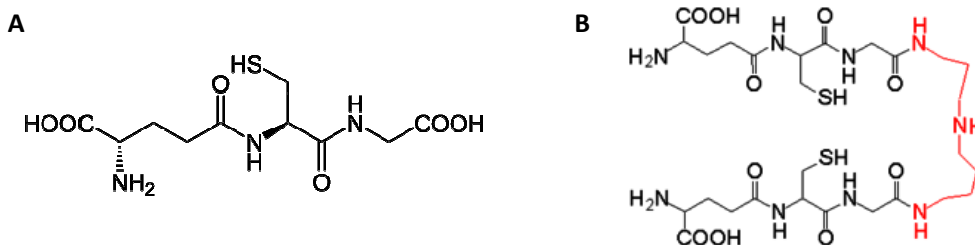
Análisis bioquímicos de promastigotes de *Leishmania* han demostrado que pueden utilizar tanto glucosa como aminoácidos, caso de la prolina, como fuentes energéticas, lo que parece lógico dado que el flebotomo se alimenta de sangre pero también de néctar. El catabolismo de estos sustratos parece involucrar tanto a la glicolisis realizada en los glicosomas, organelas exclusivas de los tripanosomátidos <sup>117</sup>, como al metabolismo mitocondrial donde hay un ciclo de los ácidos tricarbóxicos bastante activo, acoplado a una cadena de transporte de electrones.

Se sabe que en amastigotes de *L. mexicana* aislados de lesiones *in vivo*, hay una mayor beta-oxidación de ácidos grasos y una reducción en la necesidad de prolina y en el consumo de glucosa en comparación con los promastigotes <sup>118</sup>. Todas las enzimas del ciclo de ácidos tricarbóxicos y de la cadena respiratoria están presentes. Hay una menor cantidad de glicosomas que en los promastigotes <sup>119, 120</sup>, pero tienen una mayor cantidad de enzimas como la malato deshidrogenasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa <sup>121, 122</sup>.

### Control del estrés oxidativo en *Leishmania*.

El equilibrio de oxidación/reducción o equilibrio redox intracelular de todo organismo se ve afectado por el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*) y nitrógeno, subproductos del crecimiento aeróbico o del entorno en el que se encuentran. Los grupos tiol (-SH) de proteínas y compuestos de bajo peso molecular juegan un papel crucial como tampones redox que equilibran los cambios en el entorno redox intracelular<sup>123, 124</sup>. En el caso concreto de *Leishmania* y demás tripanosomátidos, existe un potente sistema regulador del estado redox intracelular que les hace capaces de soportar el elevado estrés oxidativo al que les somete el sistema inmune del huésped durante la infección y les permite adaptarse a las diferentes condiciones metabólicas y ambientales de un ciclo de vida digenético.

En los últimos cinco años se ha secuenciado el genoma completo de distintos tripanosomátidos, como son *Leishmania major*<sup>100</sup>, *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*<sup>101</sup>, *Trypanosoma brucei*<sup>125</sup> y *Trypanosoma cruzi*<sup>126</sup>, revelando que estos organismos carecen de genes codificantes para glutatión reductasa (GR), tioredoxina reductasa (TrxR) y catalasa. Aunque disponen de glutatión peroxidasas, éstas se diferencian de la de mamíferos en que no contienen selenocisteína. El metabolismo redox de los tripanosomátidos, está basado en el uso del tripanotión como principal fuente de poder reductor. El tripanotión o N<sub>1</sub>,N<sub>8</sub>-(glutationil) espermidina [T(SH)<sub>2</sub> o TS<sub>2</sub> en sus formas reducida y oxidada, respectivamente] está formado por dos moléculas de glutatión (GSH) unidas por una espermidina (fig. 6) y es sintetizado por acción de las glutatiónil-espermidín y tripanotión sintetasas (GspS y TryS respectivamente). Esta molécula se mantiene en su forma reducida por acción de la tripanotión reductasa (TryR)<sup>127-129</sup>.



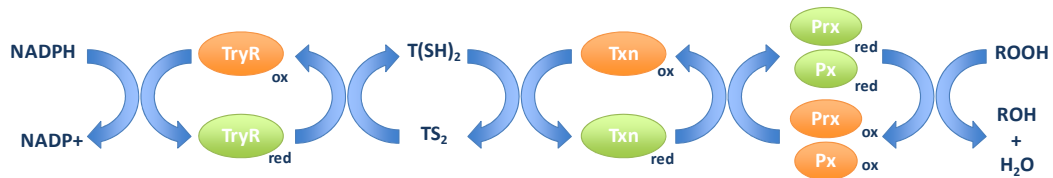
**Figura 6.** Moléculas de glutatión (A) y tripanotión (B) donde la molécula de espermidina aparece en rojo.

A pH fisiológico, los grupos tiol del T(SH)<sub>2</sub> son más reactivos que el que se encuentra en el GSH, pero no debido a sus potenciales redox, pues son muy parecidos<sup>130, 131</sup>, sino debido en primer lugar a que el T(SH)<sub>2</sub>, como ditiol, está cinéticamente favorecido como reductor de disulfuros<sup>132</sup> y, en segundo lugar, a la modificación del pK<sub>a</sub> de las cisteínas. En el caso del T(SH)<sub>2</sub> este pK<sub>a</sub> toma un valor de 7.4<sup>133</sup>, probablemente debido a la densidad de carga positiva del nitrógeno de la espermidina, mientras que en el GSH, este pK<sub>a</sub> es más de una unidad mayor<sup>134</sup>. Además, el pK<sub>a</sub> de los tioles del T(SH)<sub>2</sub> coincide con el pH intracelular del parásito<sup>135</sup> lo que seguramente contribuye a su reactividad.

En el caso de *L. infantum*, el 93% de los tioles de bajo peso molecular totales corresponden a tripanotión con una concentración intracelular en torno a 1mM<sup>136</sup>, mientras que el resto se reparte en forma de GSH y de otros compuestos de bajo peso molecular con tioles como son la mono-glutationilespermidina (Gsp) y la N<sub>1</sub>-metil-4-mercaptohistidina u ovotiol A (OvSH) que se mantienen reducidos por acción del tripanotión<sup>137</sup>.

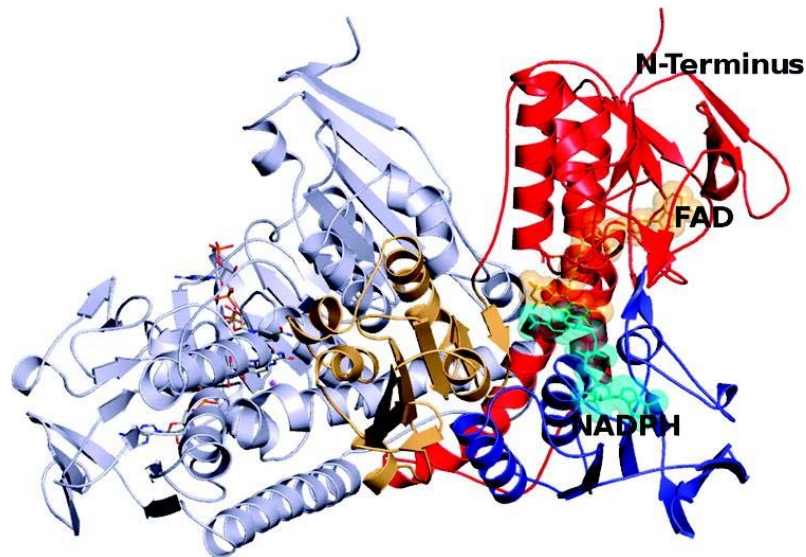
No se sabe el porqué de la predominancia del tripanotión en estos organismos. Recientemente se ha descubierto en *L. infantum* y *T. brucei* que este compuesto es capaz de interceptar al óxido nítrico (NO) y, haciéndolo reaccionar con cationes de hierro, formar un complejo de las tres especies que resulta inofensivo para los parásitos. Este proceso lo realiza con una afinidad por el NO al menos 600 veces superior a la del GSH. Mientras que el análogo del complejo dinitrosil-diglutationil de hierro formado en células de mamífero, es un potente inhibidor de la GR (IC<sub>50</sub>=4μM), el complejo con tripanotión es incapaz de inhibir a la TryR a concentraciones del orden de milimolar<sup>138</sup>. La peculiar capacidad del tripanotión para secuestrar el NO en un complejo de hierro estable e inocuo, podría explicar la predominancia de este tiol en parásitos regularmente expuestos a NO.

El sistema tripanotión/TryR sustituye muchas de las funciones metabólicas y antioxidantes de los sistemas GSH/GR y tioredoxina (Trx)/TrxR presentes en otros organismos, por lo que es imprescindible para la supervivencia de estos protozoos<sup>139-143</sup>. Dentro de las funciones metabólicas, se sabe que es el responsable del suministro de equivalentes de reducción a la ribonucleótido reductasa (RR) durante la síntesis de desoxirribonucleótidos. De hecho, el tripanotión fue la primera molécula fisiológica con tioles no proteicos que se mostró capaz de reducir espontáneamente la RR<sup>144</sup>. Además, la detoxificación de hidroperóxidos recae en una sofisticada cascada de reacciones en las que tanto el tripanotión como la TryR juegan un papel fundamental (fig. 7).



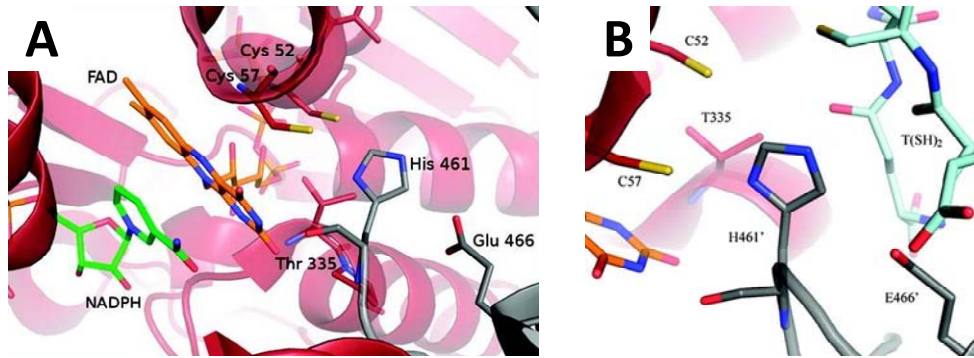
**Figura 7.** Metabolismo de hidroperóxidos mediado por tripanotión en tripanosomátidos. La detoxificación de hidroperóxidos (ROOH) es llevada a cabo por la 2-Cys-peroxirredoxina (Prx) y la enzima de tipo glutatión-peroxidasa (Px) que reciben los equivalentes de reducción de una cascada formada por la triparredoxina (Txn), el tripanotión [T(SH)<sub>2</sub> y TS<sub>2</sub>] y la TryR con el NADPH como fuente de electrones primaria. Los subíndices “red” y “ox” indican estado reducido y oxidado respectivamente.

La TryR es una flavoproteína que utiliza el flavín adenín dinucleótido (FAD) como cofactor y el NADPH como donador de electrones. Presenta un 30% de homología con la GR, lipoamida reductasa y TrxR y un 25% con el componente flavoproteico de las alquilhidroperoxirreductasas bacterianas AhpF<sup>145-147</sup>. Aunque tanto la TryR como la GR están relacionadas estructuralmente, tienen especificidad de sustrato mutuamente exclusiva, es decir, la TryR reduce el TS<sub>2</sub>, pero no el GSSG y la GR reduce el GSSG, pero no el TS<sub>2</sub><sup>148-150</sup>. A día de hoy se ha conseguido cristalizar y determinar la estructura de la TryR de *T. cruzi*<sup>151</sup>, *C. fasciculata*<sup>152, 153</sup> y *L. infantum*<sup>47</sup>. En condiciones nativas las tres enzimas se encuentran en forma de homodímero en el que cada subunidad está compuesta por tres dominios: uno de unión de FAD, otro de unión a NADPH y el tercero correspondiente al dominio de dimerización. Concretamente, para el caso de *L. infantum* (fig. 8), cada monómero tiene un peso molecular de 53 kDa. Al igual que en el caso de la GR, las TryR son activas como dímeros<sup>45</sup> y en la interfaz de dimerización hay dos centros catalíticos simétricos donde tiene lugar la reducción del TS<sub>2</sub>.



**Figura 8.** Estructura de lazos de la TryR de *L. infantum* en su forma oxidada. Uno de los monómeros aparece de color gris; en el otro, el dominio de unión de FAD (residuos 1-160 y 291-360) aparece en rojo, el de unión a NADPH (161-290) en azul y el de dimerización (361-488) en anaranjado. Los cofactores FAD y NADPH aparecen representados con bastones<sup>47</sup>.

La cristalización de la TryR de *L. infantum* en su forma reducida con NADPH y  $Sb^{III}$ , ha permitido establecer el mecanismo consenso para la reacción de actividad reductasa: comienza con la unión de NADPH que reduce transitoriamente la flavina, que a su vez reduce el puente disulfuro formado entre las cisteínas 52 y 57 del centro activo, formando un complejo de transferencia de carga estable entre la flavina y la Cys57. En este punto, se disocia  $NADP^+$  y entra una molécula nueva de NADPH. La Cys52 es entonces activada por el par His461'-Glu466' (perteneciente a la otra subunidad del dímero) y reacciona con el tripanotión oxidado ( $TS_2$ ) formando un disulfuro mixto. La Cys57 ataca la Cys52, liberándose tripanotión reducido [ $T(SH)_2$ ] y regenerándose el puente disulfuro en la enzima.



**Figura 9.** Vista general (A) y detalle (B) del centro activo de la TryR en el que se representa uno de los monómeros en gris y el otro en rojo. Los cofactores NADPH y FAD aparecen en verde y naranja respectivamente. Los residuos involucrados en la reducción del tripanotión (cian) aparecen representados con bastones <sup>47</sup>.

La ausencia del sistema tripanotión/TryR en mamíferos, la falta de redundancia funcional dentro del sistema de tioles del parásito y la exposición de los tripanosomátidos al estrés oxidativo, convierten a los componentes de este metabolismo en atractivas dianas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades producidas por la infección con estos parásitos <sup>154</sup>.

Distintas aproximaciones genéticas han demostrado que la TryR es una enzima esencial para la supervivencia de los tripanosomátidos y para su capacidad infectiva: en *L. donovani* se ha observado que es imposible obtener el individuo *knockout* para esta proteína; aún así, uno de los alelos codificantes para la misma puede ser fácilmente eliminado tanto en *L. donovani* como *L. major*, obteniendo unos mutantes que expresan una menor cantidad de ARNm de TryR, tienen una menor actividad TryR, muestran una infectividad atenuada y tienen una capacidad de supervivencia intracelular considerablemente menor a los parásitos silvestres dentro de los macrófagos siempre que estos últimos produzcan ROS <sup>139, 143</sup>. De una forma similar, se obtuvieron mutantes de *T. brucei* con una única copia del gen de la TryR, cuya expresión estaba controlada por la inducción de su promotor con tetraciclina. En función de la concentración de ésta en el medio, la actividad de la TryR podía variar entre el 1 y el 400% respecto a la del parásito silvestre. Se observó que los parásitos con una actividad menor del 10% eran incapaces de crecer en cultivo, que estos mutantes eran incapaces de infectar ratones en ausencia de tetraciclina y que la

parasitemia de ratones previamente infectados con estos parásitos, caía por completo si se retiraba la tetraciclina <sup>142</sup>.

Durante casi veinte años se han buscado inhibidores de la TryR bien desde el punto de vista del diseño de fármacos en base a la estructura de la proteína <sup>155</sup>, mediante el cribado de alto rendimiento de nuevos compuestos <sup>156, 157</sup>, por combinación de los dos anteriores <sup>158</sup> o con técnicas de modelado molecular <sup>159</sup>. Se han encontrado inhibidores reversibles, la mayoría, unos pocos irreversibles y los llamados inhibidores renegados o sustratos subversivos <sup>154</sup> como por ejemplo derivados de nitrofuranos y naftoquinonas que son reducidos por la TryR consumiendo NADPH y O<sub>2</sub>, convirtiendo de esta manera un sistema antioxidante en uno que produce estrés oxidativo. A pesar de que muchos de estos inhibidores de la TryR funcionan en el rango de micromolar sin afectar a la GR humana, ninguno de ellos ha resultado adecuado para entrar en fase clínica. Todos ellos actúan interaccionando en el sitio activo, cuya gran amplitud es un obstáculo obvio para el diseño de fármacos basado en estructura <sup>160</sup>. Además, para aquellos inhibidores capaces de ejercer su efecto a concentraciones más bajas, del orden de nanomolar, no se ha encontrado que tengan un efecto *in vivo* <sup>161</sup>, lo que confirma que las propiedades farmacocinéticas de los posibles inhibidores son vitales ya que una absorción insuficiente, una eliminación demasiado rápida o la metabolización de los mismos juegan un papel fundamental en la eficacia real del fármaco.

Parece necesaria una nueva aproximación al problema de cómo inhibir la TryR. Una vez elucidado su mecanismo de acción <sup>47</sup>, queda perfectamente establecido que la forma dimérica de la enzima es absolutamente necesaria para su actividad como reductasa. Hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba que las interacciones proteína-proteína eran el resultado de una suma algebraica de numerosas contribuciones puntuales de baja energía. Sin embargo, hoy se admite que un pequeño número de estas contribuciones resultan esenciales por ser de alta afinidad, es decir, que una buena parte de la energía de unión se localiza en regiones muy localizadas que se suelen denominar puntos calientes o *hot spots* <sup>162</sup>. Por ello hoy se considera que es posible localizar/diseñar moléculas pequeñas capaces de inhibir las interacciones proteína-proteína. Algunos ejemplos de este tipo de inhibidores se encuentran actualmente en el mercado. Los compuestos empleados para inhibir estas interacciones han surgido de distintas aproximaciones, tales como péptidos pequeños, peptidomiméticos y/o peptoides, cribado virtual, diseño basado en la estructura, y la evaluación de quimiotecas de origen natural o sintético <sup>163</sup>. Un claro ejemplo es el de la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana de

tipo 1 (HIV-1) que, al igual que la TryR, precisa presentarse en una estructura dimérica, en este caso como heterodímero, para ejercer sus actividades enzimáticas<sup>164</sup>. Esto ha llevado a proponer el proceso de dimerización de esta enzima como diana en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos frente al SIDA<sup>164</sup>. En este sentido, ha sido posible desarrollar péptidos sintéticos derivados del dominio de conexión que inhiben la actividad enzimática mediante su interferencia con el proceso de dimerización<sup>165-167</sup>.

De una forma análoga, proponemos la inhibición de la dimerización de la TryR como una estrategia interesante para la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos frente a las enfermedades producidas por los tripanosomátidos en general y de la leishmaniasis en particular.





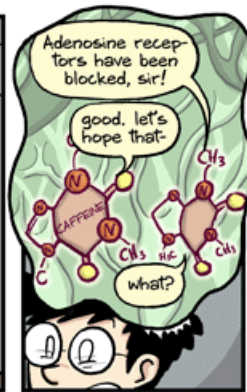
## OBJETIVOS

El presente trabajo tiene un objetivo global: la búsqueda de moléculas capaces de ejercer un potente efecto leishmanicida que sean lo suficientemente selectivas para no causar daño al individuo hospedador.

La consecución de este objetivo se ha basado en dos estrategias de trabajo:

1. Cribado de alto rendimiento de compuestos con posibilidades de ejercer un efecto anti-*Leishmania*.
2. Búsqueda de una molécula capaz de inhibir la dimerización de la TryR, enzima clave en el control del estrés oxidativo del parásito *Leishmania*.





© JORGE CHAN 2008



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos.

A excepción de algunos reactivos que se especifican en el texto, todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Los compuestos utilizados en el cribado se obtuvieron de distintas fuentes: los selenocianatos, diseleniuros e imidoselenocarbamatos fueron sintetizados por el grupo de la doctora Carmen Sanmartín, del departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra; los compuestos catiónicos de azaquinilizinio y quinolizinio fueron sintetizados por el grupo del doctor Juan José Vaquero del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá; para todos ellos se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente. Los fármacos referencia utilizados fueron la miltefosina, proporcionada por el Dr. Luis Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid y la edelfosina (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### Citometría de flujo.

Los ensayos de citometría de flujo se realizaron en un equipo Cytomics FC 500 MPL Flow Cytometry (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipado con un láser de 488 nm. Los filtros de adquisición de fluorescencia son FL-1 (520 nm), FL-2 (570 nm), FL-3 (625 nm), FL-4 (675 nm) y FL-5 (779 nm). La adquisición de los datos se realizó con el programa MXP y su posterior análisis con el programa CXP (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

### Cultivos celulares.

Los promastigotes de *L. infantum* (MCAN/ES/89/IPZ229/1/89), amablemente proporcionados por la Dra. Colmenares (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, Madrid, Spain), fueron crecidos en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% previamente inactivado, antibióticos y HEPES 25 mM. Los amastigotes de *L. infantum* fueron crecidos en medio M199 (Invitrogen, Leiden, Netherlands) suplementado con SFB al 10% previamente inactivado, antibióticos,  $\beta$ -alanina 1 g/L, L-asparagina 100 mg/L, sacarosa 200 mg/L, piruvato sódico 50 mg/L, ácido málico 320 mg/L, ácido fumárico 40 mg/L, ácido succínico 70 mg/L, ácido  $\alpha$ -cetoglutárico 200 mg/L, ácido cítrico 300 mg/L, bicarbonato sódico 1.1 g/L, MES 5 g/L, hemina 0.4 mg/L, gentamicina 10 mg/L, pH 5.4 a 37°C. Las células Jurkat, amablemente proporcionadas por el Dr. Mollinedo [Centro de Investigación del Cáncer, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.)-Universidad de Salamanca,

Salamanca, Spain], fueron crecidas en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) suplementado SFB al 10% previamente inactivado, antibióticos y HEPES 10 mM, pH 7.2 a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células THP-1, generosamente proporcionadas por el Dr. Michel (Université Nice Sophia Antipolis, Nice, France), fueron crecidas en medio RPMI-1640 (Gibco, Leiden, Netherlands) suplementado con SFB al 10% previamente inactivado, antibióticos, HEPES 1 mM, glutamina 2 mM y piruvato sódico 1 mM, pH 7.2 a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### **Axenización de amastigotes de *Leishmania* en cultivo libre de hospedador.**

4.5x10<sup>6</sup> promastigotes logarítmicos tardíos de *L. infantum* se pasaron a 5 mL de medio M199 (Invitrogen, Leiden, Netherlands) suplementado con SFB al 10% previamente inactivado, antibióticos, β-alanina 1 g/L, L-asparagina 100 mg/L, sacarosa 200 mg/L, piruvato sódico 50 mg/L, ácido málico 320 mg/L, ácido fumárico 40 mg/L, ácido succínico 70 mg/L, ácido α-cetoglutarico 200 mg/L, ácido cítrico 300 mg/L, bicarbonato sódico 1.1 g/L, MES 5 g/L, hemina 0.4 mg/L, gentamicina 10 mg/L, pH 5.4 y fueron incubados a 37°C durante 48 horas generándose amastigotes axénicos con una morfología caracterizada por la ausencia del flagelo, una disminución del tamaño celular respecto a los promastigotes y una apariencia redondeada de los parásitos.

#### **Ensayos de actividad leishmanicida y de citotoxicidad.**

El tratamiento con fármacos de promastigotes y amastigotes se llevó a cabo durante la fase de crecimiento logarítmico a una concentración de 2x10<sup>6</sup> parásitos/mL a 26°C o 1x10<sup>6</sup> parásitos/mL a 37°C durante 24 horas respectivamente. El tratamiento con fármacos de las células Jurkat y THP-1 se llevó a cabo durante la fase de crecimiento logarítmico a una concentración de 4x10<sup>5</sup> células/mL a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. El porcentaje de células vivas fue evaluado mediante citometría de flujo por el método de exclusión de yoduro de propidio (IP)<sup>168</sup>.

#### **Clonajes.**

La secuencia codificante de la eGFP fue amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tomando como molde la construcción p6.5-eGFP amablemente proporcionada por el Dr. K. P. Chang (Chicago Medical School–Rosalind Franklin University, North Chicago, IL, USA) con los siguientes oligos: 5'GGGAGATCTATGGTG-AGCAAGGGC-GAGGA3' y 5'GGGCATATGTTACTTGTACAGCTCGTCCA3'. El producto de PCR fue purificado, doblemente digerido con las endonucleasas de restricción Nde I y Bgl II y clonado en el vector pIRmcs3(-)<sup>169</sup> digerido con las mismas endonucleasas.

La secuencia codificante de la TryR fue amplificada mediante PCR, tomando como molde el ADN genómico de nuestra cepa de *L. infantum* con los siguientes oligos: 5'CCCGGATCCATGTCCC GCGGTACGA3' y 5'CCCAAGCTTTCAGAGGTTGCTGCTGA3'. El producto de PCR fue purificado, doblemente digerido con las endonucleasas de restricción BamH I y Hind III y clonado en el vector de expresión de proteínas pRSET A (Invitrogen, Leiden, Netherlands) digerido con las mismas endonucleasas.

Para la generación de la TryR marcada con el FLAG-tag, se utilizó el ADN de la TryR clonado en pRSET A que se digirió con BamH I y Hind III y se ligó al oligo de doble cadena producido al hibridar los oligos 5'GATCCGACTACAAAGACGACGACGACAAAG3' y 5'GATCCTTTGTCGTCGTCGT-CTTTGTAGTCG3' obteniendo la construcción TryR-FLAG con extremos 5'BamH I y 3'Hind III. La construcción TryR-FLAG se clonó en el vector de expresión de proteínas pET24a (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt, Germany) digerido con las enzimas BamH I y Hind III.

### **Transfección estable de promastigotes.**

Los parásitos fueron recogidos en la fase de crecimiento logarítmico y transfectados mediante electroporación con el protocolo previamente descrito<sup>168</sup>. La cepa transfectada estable se seleccionó en RPMI-1640 con SFB al 20% previamente inactivado con nourseotricina 100 µg/mL (Axxora, San Diego, CA, USA). La construcción pIRmcs3-eGFP fue linearizada con la enzima Swa I y purificada de un gel de agarosa (Illustra GFX gel purification kit, General Electric, UK) antes de la transfección.

### **Microscopía confocal.**

Los parásitos se analizaron en fresco en un microscopio Leica TCS-SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) dotado de tres láseres de excitación: diodo UV a 405 nm, argón a 488 nm y helio/neón a 561/633 nm. Para realizar el marcaje de los núcleos y las membranas de los macrófagos se utilizó medio RPMI-1640 con Hoechst 33258 0.1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y CellMask<sup>TM</sup> Deep Red (Invitrogen, Leiden, Netherlands) 2 µg/mL respectivamente. Se incubaron las células durante 10 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se lavaron las células tres veces con 1X PBS y se observaron directamente en el microscopio confocal. Para cada fluoróforo: el Hoechst se excita a 405 nm y se detecta a 430-490 nm, la eGFP se excita a 488 nm y se detecta a 500-590 nm y el CellMask<sup>TM</sup> Deep Red se excita a 633 nm y se detecta a 650-723 nm.



### **Ensayo de infección con *Leishmania*.**

Las células THP-1 fueron sembradas a una concentración de 120.000 células/mL en placas multipocillo P24 (Nunc, Roskilde, Denmark) y diferenciadas a macrófagos durante 24 horas en 1 mL de medio RPMI-1640 con forbol 12-miristato 13-acetato 10 ng/mL (PMA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). El medio de cultivo fue retirado y se añadieron  $1.2 \times 10^6$  amastigotes de *Leishmania* en 1 mL de medio de THP-1 a cada pocillo. Tres horas más tarde, se retiró el medio con los amastigotes que no habían infectado, se lavaron las células tres veces con suero salino tamponado con fosfato (1X PBS) y se añadió nuevo medio de cultivo de THP-1 y el correspondiente tratamiento. Tras 48 ó 96 horas de tratamiento, se retiró el medio, se lavaron las células tres veces con 1X PBS y se despegaron de la placa con TrypLE™ Express (Invitrogen, Leiden, Netherlands) siguiendo las instrucciones del fabricante. La infección fue cuantificada mediante citometría de flujo en el canal FL-1 correspondiente a la fluorescencia verde.

### **Modelado por homología y predicción de *hot-spots* de dimerización.**

Los alineamientos de secuencia se realizaron utilizando el programa CLUSTALW2 <sup>170</sup> (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Para construir el modelo de la TryR se utilizó el programa SWISS-MODEL <sup>171, 172</sup> (<http://swissmodel.expasy.org/>). La predicción de los hot-spots de dimerización se realizó mediante el empleo de los programas NACCESS <sup>173</sup> (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/>), AMBER <sup>174</sup> (<http://ambermd.org/>) y por observación de la estructura del modelo con el visor de estructuras PyMOL (<http://www.pymol.org/>).

### **Mutagénesis.**

A la hora de generar las distintas mutantes se diseñaron los correspondientes oligos con el programa online de la casa Stratagene llamado Quik Change® Primer Design Program (<http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>). Los oligos empleados para cada mutante fueron: W81A 5'GTCTGGCGGCTTCGGAGCGGAGATGAACCGC3' y 5'GCGTTTCATCTCCGCTCCGAAGCCGCCAGAC3'; E436A 5'GACAGCGCGCCTGCGATCATC-CAGAGC3' y 5'GCTCTGGATGATCGCAGGCGCGCTGTC3'; Q439A 5'CGCGCCTGAGATCAT-CGCGAGCGTCGGTATTTGC3' y 5'GCAAATACCGACGCTCGCGATGATCTCAGGCGCG3'; E436K 5'CGGCGACAGTGCGCCTAAGATCATCCAGAG3' y 5'CTCTGGATGATCTTAGGCGCA-CTGTCGCCG3'; C444S 5'CCAGAGCGTCGGCATTAGCATGAAGATG-GG3' y 5'CCCATCTTC-ATGCTAATGCCGACGCTCTGG3'. La mutagénesis se realizó mediante PCR con el kit Quik Change II XL (Stratagene-Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) siguiendo

las indicaciones del fabricante. Se comprobó el éxito de la mutagénesis mediante secuenciación de ADN.

### **Expresión y purificación de proteínas.**

Los ADNs de la TryR silvestre y de las distintas mutantes, clonados dentro del vector pRSET A, fueron transformados en la cepa BL21 (DE3) pLysSs de *E. coli*. Se crecieron en medio LB (*Luria Bertoni broth*) con ampicilina 100 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL a 37°C y 220 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4, momento en el que se indujo la expresión adicionando isopropyl β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y se incubaron a 26°C y 220 rpm durante 16 horas. El cultivo resultante se recogió por centrifugación a 8000 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet húmedo se resuspendió en tampón con NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0 y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), y se lisó añadiendo lisozima 1 mg/mL e incubando 30 minutos en hielo para después sonicar 20 minutos en hielo mediante pulsos del 50% a potencia 7 con un Sonifier Cell Disruptor B15 (Branson, Danbury, CT, USA). El lisado se centrifugó a 8000 g y 4°C durante 1 hora y 30 minutos. Decantamos el sobrenadante desechando el pellet y se volvió a sonicar en las mismas condiciones 5 minutos más. El lisado se cargó en la columna de cromatografía (KimbleKontes-Gerresheimer, Düsseldorf, Germany) con resina de sefarosa acoplada a ácido nitrilotriacético-níquel (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) equilibrada con el tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0. Se lavó la proteína unida con tampón NaCl 300 mM, 50 mM imidazol, Tris 50 mM pH 8.0 y se eluyó con un gradiente de imidazol de 50 a 500 mM en tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0. Las fracciones que contenían cada proteína más pura se combinaron y concentraron utilizando un Amicon Ultra-4 (Milipore, Billerica, MA, USA) con una membrana con diámetro de poro para proteínas de 30 kDa, donde se retiró el imidazol mediante lavados sucesivos con tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0. Una vez cuantificada y para su posterior almacenamiento a -80°C, se diluyó cada proteína al 50% en glicerol.

El ADN de la TryR silvestre con el FLAG-tag clonado dentro del vector pET24a, fue transformado en la cepa Rosetta de *E. coli*. Se crecieron en medio LB (*Luria Bertoni broth*) con kanamicina 100 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL a 37°C y 220 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4, momento en el que se indujo la expresión adicionando isopropyl β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y se incubaron a 26°C y 220 rpm durante 16 horas. El cultivo resultante se recogió por centrifugación a 8000 g durante 5 minutos a 4°C. El pellet húmedo se resuspendió en tampón con NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0 y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), y se lisó añadiendo lisozima 1 mg/mL e incubando 30 minutos en hielo para

después sonicar 20 minutos en hielo mediante pulsos del 50% a potencia 7 con un Sonifier Cell Disruptor B15 (Branson, Danbury, CT, USA). El lisado se centrifugó a 8000 g y 4°C durante 1 hora y 30 minutos. Decantamos el sobrenadante desechando el pellet y se volvió a sonicar en las mismas condiciones 5 minutos más. El lisado se purificó con el T7-Tag® Affinity Purification Kit (Novagen-Merck KGaA, Darmstadt, Germany) según las instrucciones del fabricante. Las fracciones que contenían la proteína más pura se combinaron y concentraron utilizando un Amicon Ultra-4 (Milipore, Billerica, MA, USA) con una membrana con diámetro de poro para proteínas de 30 kDa, donde se retiró el imidazol mediante lavados sucesivos con tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0. Una vez cuantificada y para su posterior almacenamiento a -80°C, se diluyó al 50% en glicerol.

#### **Ensayo de actividad de TryR.**

Se diseñó el ensayo según el protocolo propuesto por Hamilton *et al.*<sup>175</sup>. Se trata de un ensayo multipocillo en placas P96 (Nunc GmbH, Langenselbold, Germany) en un volumen final de 250 µL con TryR 7.5 nM, HEPES 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NADPH 0.15 mM y DTNB 25 µM en el que se dispara la reacción adicionando TS<sub>2</sub> 1 µM. Se sigue el curso de la reacción registrando la absorbancia a 405 nm durante una hora en un espectrómetro Wallac 1420 VICTOR<sup>2</sup> (EG&G Wallac, Gaithersburg, MD, USA).

Para los ensayos cinéticos se montaron reacciones de actividad de TryR como la anterior variando la concentración de TS<sub>2</sub>: 5 µM, 15.625 µM, 31.25 µM, 62.5 µM, 125 µM, 250 µM, 500 µM y 1 mM. El tripanotión oxidado se compró a la casa Bachem (Bachem GmbH, Weil am Rhein, Germany).

Los datos se analizaron mediante regresión no lineal con el programa informático GraFit 6 (Erithacus, Horley, Surrey, UK).

#### **Dicroísmo circular.**

Las mediciones de los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J720 (Jasco, Easton, MD, USA), registrando el espectro entre las longitudes de onda 200-260 nm, a 4°C y con paso de celda de 1 mm. El programa de adquisición de datos es el Spectrum Measurement (Jasco, Easton, MD, USA). Se realizaron 4 medidas para cada muestra de proteína a 0.5 mg/mL en tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0 y se promediaron.

**Electroforesis en condiciones nativas.**

Las muestras se prepararon diluyendo cada proteína purificada en proporción 9:1 con tampón nativo 10X (Tris-HCl 0.2 M pH 8.8, glicerol 84%, azul de bromofenol 1%). Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM pH 8.8, glicina 200 mM, a 90 V y 4°C durante 3 horas.

**Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.**

Las muestras para la electroforesis se diluyendo cada proteína purificada en proporción 3:1 con tampón de carga 4X (Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 20% glicerol, SDS 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5%, azul de bromofenol 1%) e hirviéndolas durante 5 minutos a 95 °C. Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM pH 8.8, glicina 290 mM y SDS 0,1% a 200 V durante una hora.

**Tinción de geles de poliacrilamida.**

Una vez finalizadas las electroforesis, las proteínas se tiñeron sumergiendo los geles de poliacrilamida en una solución de azul de Coomassie 0.25%, etanol 50%, ácido acético 10% durante 10 minutos con agitación y se retiró la tinción inespecífica sumergiendo los geles en una solución de etanol 50%, ácido acético 10 % durante una hora con agitación, para lavarlos finalmente en agua destilada durante 24 horas con agitación.

**Ultracentrifugación analítica.**

Todos los experimentos se realizaron en una ultracentrífuga analítica XL-1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron a 20°C con las muestras de cada proteína a 1 mg/mL en tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0 tomando como referencia una celda con el tampón sin proteína. Los experimentos de equilibrio de sedimentación se realizaron a 20°C con las muestras de proteína a 3 concentraciones distintas, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/mL en tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0 tomando como referencia una celda con el tampón sin proteína. El programa utilizado para el análisis de los datos es el Sedfit 11.71<sup>176</sup> (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedfit.htm>).

### **Ensayo de unión de FAD.**

Se cuantificó la absorbancia de las muestras a 280 y 450 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech-GE healthcare, Piscataway, NJ, USA) utilizando una cubeta de cuarzo (Hellma, Müllheim, Germany) de 10 mm de paso.

### **Péptidos.**

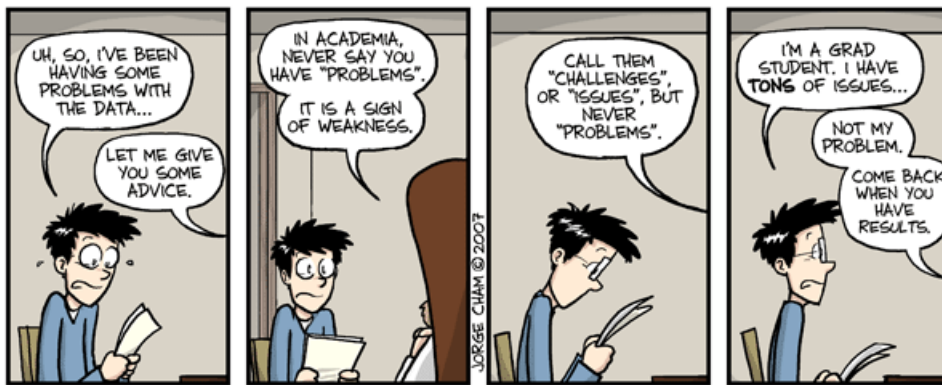
Todos los péptidos fueron sintetizados por Peptide Protein Research (Funtley, Fareham, UK).

### **Ensayo de dimerización e inhibición de la dimerización in vitro de la TryR.**

Se incubaron FLAG-TryR 400nM, His-TryR 400nM y una mezcla de las dos a las mismas concentraciones en un volumen total de 200  $\mu$ L de tampón NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 8.0 en presencia y ausencia del péptido 3 durante 16 horas a 37°C con agitación. Se pasaron las muestras a una placa ANTI-FLAG® HS, M2 COATED (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) donde se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. La proteína no unida se retiró lavando cuatro veces con tampón TBST (salino tamponado con fosfato y Tween-20 al 1%). Para detectar la TryR-His unida, se añadieron 200  $\mu$ L de anticuerpo policlonal anti-His de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluido 1:5000 en TBST y se incubó durante una hora. Después la placa fue lavada 5 veces con TBST y se añadieron 200  $\mu$ L de anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluido 1:10000 en TBST y se incubó durante una hora. Para detectar la TryR total unida, se añadieron 200  $\mu$ L de anticuerpo policlonal anti-T7 de cabra (Abcam, Cambridge, MA, USA), diluido 1:5000 en TBST y se incubó durante una hora. Después la placa fue lavada 5 veces con TBST y se añadieron 200  $\mu$ L de anticuerpo anti-cabra conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluido 1:10000 en TBST y se incubó durante una hora. A continuación la placa fue lavada 5 veces con TBST y se añadieron 100  $\mu$ L de solución de dihidrocloruro de 1,2-fenilenediamina (OPD) y se incubó durante 10 minutos. Se leyó la absorbancia a 490 nm. Todas las incubaciones en la placa fueron realizadas a temperatura ambiente.

### **Análisis estadístico.**

En los análisis estadísticos se realizó una comparación de medias con el T-test de dos colas y no pareado mediante el programa Excel (Microsoft).





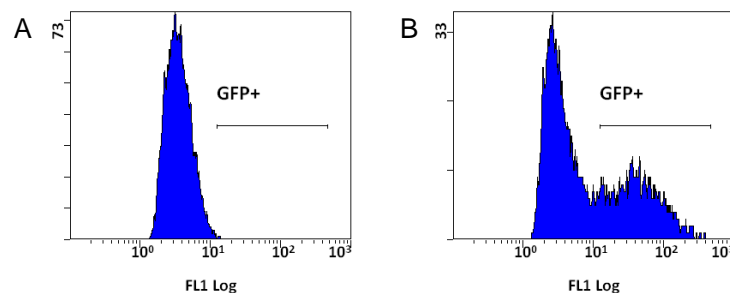
## RESULTADOS

Como hemos comentado en los objetivos, el trabajo que corresponde a esta tesis se divide en dos bloques, el primero de ellos dedicado a la búsqueda sistemática de nuevos compuestos con actividad leishmanicida y el segundo basado en una estrategia dirigida utilizando la TryR como diana terapéutica.

### 1. Cribado de alto rendimiento de compuestos con posibilidades de ejercer un efecto leishmanicida.

#### 1.1. Infecciones de macrófagos con amastigotes de *L. infantum*.

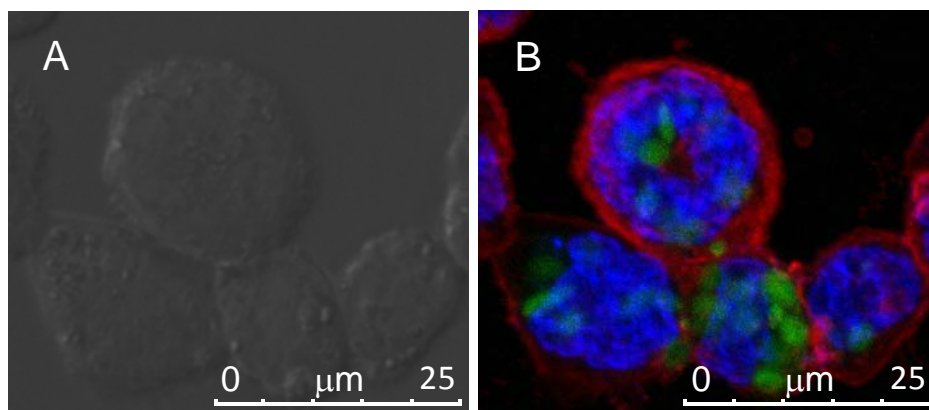
A la hora de evaluar la actividad leishmanicida de cualquier compuesto, existen multitud de opciones perfectamente validadas en las que se prueba la efectividad de la molécula sobre el parásito libre. Las mayores dificultades surgen cuando se quiere evaluar dicha actividad en parásitos que se encuentren dentro de un macrófago tras una infección. El primer problema radica en cómo detectarlos. Históricamente se ha recurrido a la tinción con Giemsa, mediante la cual los protozoos adquieren una tonalidad azul, para posteriormente recurrir a un conteo visual o mediante algún programa informático basado en la captura de imágenes al microscopio. Esta técnica resulta tediosa y con un margen de error alto, por lo que nos planteamos una estrategia alternativa. Mediante técnicas de biología molecular, obtuvimos una cepa de *L. infantum* capaz de expresar una forma recombinante de la proteína fluorescente verde (eGFP). Con los amastigotes de dicha cepa, se realizaron las infecciones de los macrófagos humanos THP-1, de tal manera que las células infectadas pueden ser fácilmente detectadas gracias a la fluorescencia emitida por los amastigotes intracelulares (Fig. 10) mediante citometría de flujo.



**Figura 10.** Macrófagos THP-1 sin infectar (A) o infectados con amastigotes de *L. infantum* que expresan eGFP (B) registrados mediante citometría de flujo en el canal FL-1 (fluorescencia verde).



El segundo problema a la hora de evaluar infecciones es cómo saber si los parásitos detectados están dentro del macrófago o simplemente adheridos al exterior de la membrana celular, problema que no resuelve la tinción con Giemsa. En nuestro caso, para certificar que los amastigotes estaban dentro de los macrófagos evaluamos las infecciones mediante microscopía confocal (Fig. 11).



**Figura 11.** Fotografías de macrófagos THP-1 infectados con amastigotes de *L. infantum* mediante microscopía confocal. A: Contraste de fases. B: Combinación de fluorescencias azul (núcleos teñidos con Hoechst 33258), rojo (membranas teñidas con CellMask™ Deep Red) y verde (amastigotes expresando la eGFP).

## 1.2. Compuestos con selenio (Se).

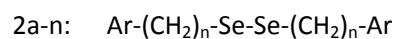
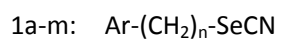
Recientemente se ha empezado a explorar el desarrollo y utilización de complejos metálicos como potentes agentes quimioterapéuticos frente a la leishmaniasis. Así, algunos compuestos organometálicos y complejos de coordinación de paladio, oro, iridio, rodio, platino y sulfato de zinc han sido probados frente al parásito *Leishmania*<sup>177</sup>. Además se han testado algunos intercalantes metálicos del ADN basados en platino, cobre y plata, demostrando tener una notable actividad anti-*Leishmania*<sup>178</sup>. Otro oligoelemento destacable es el Se. En este sentido, estudios previos realizados en nuestro laboratorio<sup>179</sup> demostraron que el 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-1 o ebselen, un compuesto heterocíclico que contiene Se, posee un potente efecto leishmanicida. Así mismo, recientemente se ha comprobado que el incremento de la concentración de Se en plasma constituye una nueva estrategia defensiva frente a la

infección por *Leishmania*<sup>180, 181</sup> o *Trypanosoma*<sup>182, 183</sup>. Las rutas bioquímicas a través de las cuales actúa el Se, así como sus dianas celulares aún no han sido elucidadas.

En base a todo esto y debido a la imperiosa necesidad de nuevos fármacos en la lucha contra la leishmaniasis, planteamos una colaboración con el grupo de la doctora Carmen Sanmartín, del departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra, con el fin de aprovechar el trabajo llevado a cabo previamente por su grupo y orientado a la síntesis de derivados de Se con actividad anti-cancerígena<sup>184-186</sup>. En el intento de encontrar compuestos leishmanicidas más potentes y selectivos de los disponibles en el arsenal farmacológico actual hemos evaluado la eficacia de selenocianatos, diseleniuros, imidoselenocarbamatos e imidotiocarbamatos frente a *Leishmania*.

### Selenocianatos y diseleniuros.

Los selenocianatos (1a-m) y diseleniuros (2a-n) responden a las siguientes fórmulas químicas:



Donde el anillo o anillos aromáticos (Ar) y la longitud de la cadena carbonada (n) varían para cada compuesto. En primer lugar se probaron *in vitro* los compuestos a tres concentraciones diferentes (6.25, 12.5 y 25  $\mu\text{M}$ ) frente a promastigotes de *L. infantum*. Los porcentajes de inhibición del crecimiento aparecen recopilados en la tabla 1.

**Tabla 1.** Actividades *in vitro* de los compuestos frente a promastigotes de *L. infantum* expresada en inhibición del crecimiento (%) a las 24 horas.

Compuesto	Anillo aromático (Ar)	n	25µM	12.5µM	6.25µM
1a	4-aminofenil	0	76.3	38.2	14.4
1b	4-(N,N-dimetilamino)fenil	0	97.3	86.7	54.4
1c	4-amino-3-carboxifenil	0	SE*	-	-
1d	4-acetamido-3- carboxifenil	0	SE	-	-
1e	4-nitrofenil	1	98.0	95.0	82.3
1f	4-bromofenil	1	97.1	80.8	49.2
1g	4-trifluorometilfenil	1	98.8	97.2	79.4
1h	4-metiltiofenil	1	97.2	92.9	77.3
1i	4-metilfenil	1	98.6	82.8	52.8
1j	4-cianofenil	1	97.0	80.4	51.5
1k	fenil	1	99.4	64.1	46.5
1l	naftil	1	91.5	81.1	37.1
1m	4-nitrofenil	2	88.9	81.8	46.6
2a	4-aminofenil	0	98.0	97.6	95.8
2b	4-(N,N-dimetilamino)fenil	0	77.6	67.7	51.5
2c	4-amino-3-carboxifenil	0	SE	-	-
2d	4-acetamido-3- carboxifenil	0	SE	-	-
2e	4-nitrofenil	1	98.7	96.3	81.8
2f	4-bromofenil	1	12.2	1.9	SE
2g	4-trifluorometilfenil	1	12.2	6.0	11.0
2h	4-metiltiofenil	1	17.5	SE	SE
2i	4-metilfenil	1	2.5	SE	SE
2j	4-cianofenil	1	32.8	21.9	10.9
2k	fenil	1	60.4	43.6	33.2
2l	naftil	1	SE	-	-
2m	4-nitrofenil	2	28.4	3.2	1.2
2n	4-metoxifenil	1	31.7	9.9	0.5

\* SE: Sin efecto.

Quince de los veintisiete compuestos evaluados producen una inhibición en el crecimiento de los promastigotes superior al 50% a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , trece de estos son capaces de inhibir más del 50% el crecimiento celular a una concentración intermedia y los nueve compuestos más potentes mantienen esta inhibición a 6.25  $\mu\text{M}$ . Estos quince compuestos pasaron a la siguiente fase de cribado en la que se evaluó su actividad frente a amastigotes de *L. infantum*; al mismo tiempo se estudió su citotoxicidad frente a células humanas, concretamente células Jurkat (linfocitos) y THP-1 (monocitos).

Al objeto de determinar las concentraciones que causan un 50% de inhibición del crecimiento ( $\text{IC}_{50}$ ) a las 24 horas, la actividad de cada compuesto se analizó a cinco concentraciones diferentes: 0.08, 0.4, 2.0, 10.0 y 50.0  $\mu\text{M}$ . Miltefosina y edelfosina fueron usadas como fármacos referencia.

**Tabla 2.** Valores de  $\text{IC}_{50} \pm \text{DE}$  (desviación estándar) ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos más activos para promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y citotoxicidad frente a células Jurkat y THP-1.

Compuesto	Promastigote	Amastigote	Jurkat	IS <sup>a</sup>	THP-1	IS
<b>1a</b>	11.2 $\pm$ 1.1	9.3 $\pm$ 1.2	43.8 $\pm$ 6.2	5	> 50	> 5
<b>1b</b>	9.2 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.2	29.3 $\pm$ 1.2	10	44.7 $\pm$ 3.4	16
<b>1e</b>	4.3 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 1.3	10	16.8 $\pm$ 1.8	25
<b>1f</b>	11.6 $\pm$ 0.6	7.9 $\pm$ 1.0	12.7 $\pm$ 2.1	2	28.9 $\pm$ 3.9	4
<b>1g</b>	11.3 $\pm$ 0.4	2.1 $\pm$ 1.0	7.3 $\pm$ 0.4	3	19.8 $\pm$ 2.7	9
<b>1h</b>	11.6 $\pm$ 0.7	3.0 $\pm$ 0.6	5.1 $\pm$ 1.0	2	17.0 $\pm$ 1.8	6
<b>1i</b>	11.8 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.8	14.4 $\pm$ 1.7	4	24.0 $\pm$ 2.2	7
<b>1j</b>	4.1 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	13.4 $\pm$ 2.5	24	8.0 $\pm$ 1.0	15
<b>1k</b>	7.9 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.2	10.7 $\pm$ 1.7	4	25.0 $\pm$ 2.9	10
<b>1l</b>	11.2 $\pm$ 1.2	3.7 $\pm$ 1.1	14.0 $\pm$ 1.4	4	16.8 $\pm$ 3.1	5
<b>1n</b>	11.9 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 1.2	1	17.2 $\pm$ 2.2	5
<b>2a</b>	1.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	20.4 $\pm$ 2.8	32	15.3 $\pm$ 0.8	24
<b>2b</b>	3.2 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.0	> 50	> 65	22.1 $\pm$ 1.4	29
<b>2e</b>	4.0 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.0	26.8 $\pm$ 3.3	71	29.1 $\pm$ 2.3	77
<b>2k</b>	17.8 $\pm$ 1.9	0.6 $\pm$ 0.0	26.1 $\pm$ 5.9	41	32.2 $\pm$ 2.5	51
<b>Edelfosina</b>	3.6 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	12.2 $\pm$ 2.4	15	5.0 $\pm$ 0.2	6
<b>Miltefosina</b>	15.0 $\pm$ 10.8	2.8 $\pm$ 0.1	48.2 $\pm$ 4.8	17	18.5 $\pm$ 0.6	7

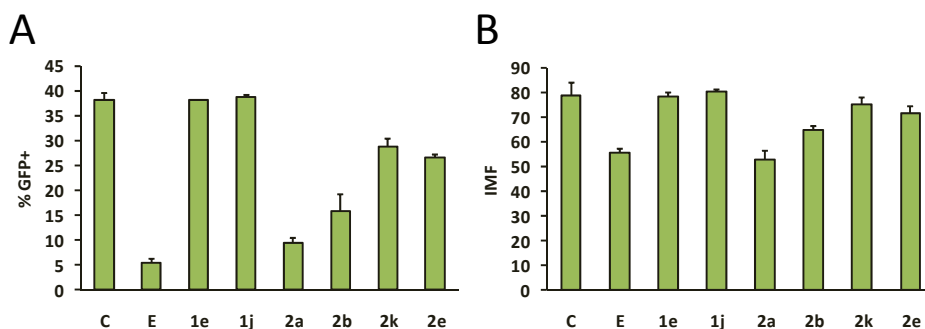
<sup>a</sup> El índice de selectividad (IS) es la ratio de los valores de  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos para células Jurkat o THP-1 respecto a los valores para los amastigotes de *L. infantum*.

Atendiendo a los valores de IC<sub>50</sub> para los amastigotes, 9 de los compuestos ensayados se muestran más potentes que la miltefosina (**1b, 1g, 1e, 1j, 1k, 2a, 2b, 2e y 2k**). Además, 6 de ellos tienen una actividad leishmanicida más alta que la edelfosina (**1e, 1j, 2a, 2b, 2e y 2k**).

En lo que se refiere a la citotoxicidad frente a las células humanas ensayadas, se comprueba que los IS de los diseleniuros son siempre mayores que los de los correspondientes selenocianatos.

El análisis de la selectividad de los diseleniuros frente a amastigotes en comparación con células Jurkat reveló que sus IS, partiendo de un valor de 71 decrecen según el orden **2e>2b>2k>2a** hasta alcanzar un valor de 32. En la comparación frente a células THP-1, la mayor selectividad la alcanza de nuevo el compuesto 2e, con un valor de 77, disminuyendo en el orden **2e>2k>2b>2a**, rindiendo este último un valor de 24. La comparación con los IS de edelfosina (IS = 15 para Jurkat e IS = 6 para THP-1) y miltefosina (IS = 17 para Jurkat e IS = 7 para THP-1) revela que el compuesto **2e** es 7.5 y 12.7 veces más selectivo que la edelfosina para células Jurkat y THP-1 y 4 y 11 veces más selectivo que la miltefosina para las mismas líneas celulares.

La actividad leishmanicida de las seis moléculas más activas fue evaluada mediante citometría de flujo en macrófagos infectados. Células THP-1 diferenciadas a macrófagos fueron infectadas con amastigotes de *L. infantum* que expresan la eGFP y posteriormente tratadas con los compuestos 1e, 1j, 2a, 2b, 2k y 2e durante 48 horas (Fig. 12).



**Figura 12.** Actividad de los compuestos en macrófagos THP-1 infectados con amastigotes. A: Porcentaje de macrófagos THP-1 que emiten fluorescencia verde tras 48 horas de tratamiento con DMSO (C), edelfosina 3 $\mu$ M (E), compuesto **1e** 3 $\mu$ M, compuesto **1j** 3 $\mu$ M, compuesto **2a** 3 $\mu$ M, compuesto **2b** 3 $\mu$ M, compuesto **2k** 3 $\mu$ M o compuesto **2e** 3 $\mu$ M. La fluorescencia verde es debida a la presencia de amastigotes de *L. infantum* que expresan la eGFP dentro de los macrófagos. B: Intensidad media de fluorescencia (IMF) verde de los macrófagos THP-1 que contienen amastigotes que expresan eGFP tras 48 horas de tratamiento con DMSO (C), edelfosina 3 $\mu$ M (E), compuesto **1e** 3 $\mu$ M, compuesto **1j** 3 $\mu$ M, compuesto **2a** 3 $\mu$ M, compuesto **2b** 3 $\mu$ M, compuesto **2k** 3 $\mu$ M o compuesto **2e** 3 $\mu$ M. La IMF es proporcional a la cantidad de amastigotes de *L. infantum* presentes en el interior de las células.

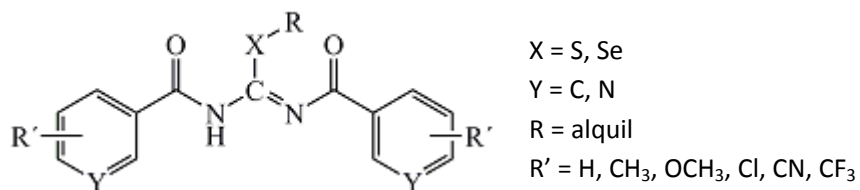
Mientras que el cultivo control de macrófagos infectados y tratados con DMSO muestra un 37% de células infectadas, en aquellos cultivos tratados con edelfosina dicho porcentaje se reduce en un 90% (5% de células infectadas); entre los diseleniuros destaca el compuesto **2a**, que lo disminuye un 75% (10% de células infectadas) y el **2b** que lo hace un 60% (15% de células infectadas) (Fig. 12A). Atendiendo a la IMF de los macrófagos que todavía quedan infectados, que nos da una idea de la cantidad de amastigotes intracelulares, observamos que tanto la edelfosina como el compuesto **2a** reducen el número de los mismos en un 30%, mientras que el compuesto **2b** lo reduce en un 18% (Fig. 12B).

De todos los compuestos investigados, el compuesto **2a** es el que exhibe un mejor perfil como molécula leishmanicida. Sus IS respecto a células humanas, 24 para THP-1 y 32 para Jurkat, resultan del orden de 2 y hasta 4 veces mayores que los obtenidos con edelfosina o miltefosina, fármacos de referencia contra *Leishmania*. Además, su efectividad en macrófagos infectados, donde tiene una muy baja citotoxicidad, queda fuera de toda duda, llegando a rebajar los niveles de la infección hasta valores en el rango de los de la edelfosina.

### Alquil-imidoselenocarbamatos y alquil-imidotiocarbamatos.

Estudios previos han demostrado que, alquil-imiditiocarbamatos con actividad antitumoral, veían incrementada la misma si se realizaba la sustitución isostérica del azufre (S) por Se<sup>187-190</sup>, por lo que nos planteamos si este sería el caso para aquellos compuestos que presentaran actividad anti-*Leishmania*.

La fórmula química general es la siguiente:



En primer lugar se probaron *in vitro* los compuestos a 3 concentraciones diferentes (6.25, 12.5 y 25  $\mu$ M) frente a promastigotes de *L. infantum*.

**Tabla 3.** Actividades *in vitro* de los compuestos frente a promastigotes de *L. infantum* expresada en inhibición del crecimiento (%) a las 24 horas.

Compuesto	X	Y	R	R'	25 $\mu$ M	12.5 $\mu$ M	6.25 $\mu$ M
1	S	N	metil	2-Cl	4.1	3.6	4.6
2	Se	N	metil	2-Cl	77.3	64.7	48.8
3	S	N	metil	H	SE*	-	-
4	Se	N	metil	H	94.3	88.8	78.7
5	S	C	metil	H	9.1	6.5	14.1
6	Se	C	metil	H	46.9	35.2	35.8
7	Se	C	metil	3,5-diOCH <sub>3</sub>	59.4	45.1	33.0
8	Se	C	isopropil	3,5-diOCH <sub>3</sub>	16.6	11.7	SE
9	Se	C	metil	3,4,5-triOCH <sub>3</sub>	SE	-	-
10	Se	C	metil	4-Cl	19.3	22.9	23.4
11	Se	C	isopropil	4-Cl	28.2	22.4	21.1
12	S	C	metil	4-CH <sub>3</sub>	17.8	8.9	8.7
13	Se	C	metil	4-CH <sub>3</sub>	62.4	30.3	19.1
14	Se	C	metil	4-CF <sub>3</sub>	63.7	47.0	37.8
15	Se	C	metil	4-CN	72.7	60.4	43.1

\* SE: Sin efecto.

De los quince compuestos evaluados, seis producen una inhibición del crecimiento superior al 50% a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ , tres de estos siguen superando este umbral de inhibición a 12.5 $\mu\text{M}$  y solo uno de ellos lo hace a 6.25  $\mu\text{M}$ . La actividad de estos seis compuestos fue evaluada frente a amastigotes de *L. infantum* y, con objeto de determinar su citotoxicidad, frente a las líneas celulares humanas Jurkat (linfocitos) y THP-1 (monocitos). Se utilizaron edelfosina y miltefosina como fármacos referencia. Para el cálculo de los valores de  $\text{IC}_{50}$  a las 24 horas, se probó cada compuesto con cada línea celular a cinco concentraciones diferentes 0.08, 0.4, 2.0, 10.0 y 50.0  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 4.** Valores de  $\text{IC}_{50} \pm \text{DE}$  ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos más activos para promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y citotoxicidad frente a células Jurkat y THP-1.

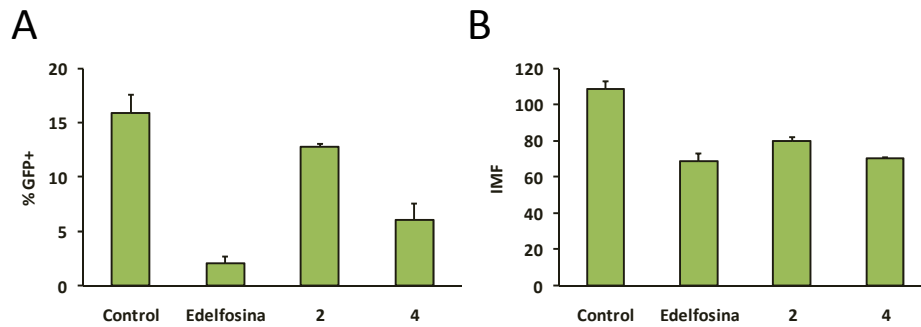
Compuesto	Promastigote	Amastigote	Jurkat	SI <sup>a</sup>	THP-1	SI
<b>2</b>	31.6 $\pm$ 3.3	4.7 $\pm$ 0.5	25.2 $\pm$ 5.0	5	22.6 $\pm$ 1.1	5
<b>4</b>	3.7 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.5	2	11.8 $\pm$ 2.4	4
<b>7</b>	18.2 $\pm$ 0.4	14.9 $\pm$ 0.8	20.4 $\pm$ 6.0	1	26.9 $\pm$ 2.9	2
<b>13</b>	28.5 $\pm$ 1.0	13.4 $\pm$ 3.8	27.5 $\pm$ 3.9	2	24.1 $\pm$ 1.5	2
<b>14</b>	29.0 $\pm$ 0.7	17.6 $\pm$ 1.0	20.0 $\pm$ 0.8	1	15.3 $\pm$ 0.7	1
<b>15</b>	30.9 $\pm$ 2.3	16.6 $\pm$ 0.7	26.4 $\pm$ 3.3	2	36.3 $\pm$ 2.7	2
<b>Edelfosina</b>	3.6 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	12.2 $\pm$ 2.4	15	5.0 $\pm$ 0.2	6
<b>Miltefosina</b>	15.0 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 0.1	48.2 $\pm$ 4.8	17	18.5 $\pm$ 0.6	7

<sup>a</sup> El índice de selectividad (IS) es la ratio de los valores de  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos para células Jurkat o THP-1 respecto a los valores para los amastigotes de *L. infantum*.

Los mejores IS son los obtenidos para los compuestos **2** y **4**, que además son los más activos frente a amastigotes de *L. infantum*. Los valores son similares a los obtenidos con miltefosina y edelfosina para THP-1, pero menores de los que se obtienen con estos fármacos de referencia para Jurkat.

La actividad leishmanicida de las seis moléculas más activas fue evaluada mediante citometría de flujo en macrófagos infectados. Células THP-1 diferenciadas a macrófagos fueron infectadas con amastigotes de *L. infantum* que expresan la eGFP y posteriormente tratadas con los compuestos **2**, **4**, **7**, **13**, **14** y **15** durante 96 horas. Las células infectadas se identificaron por la fluorescencia verde de sus amastigotes intracelulares (Fig. 13A).





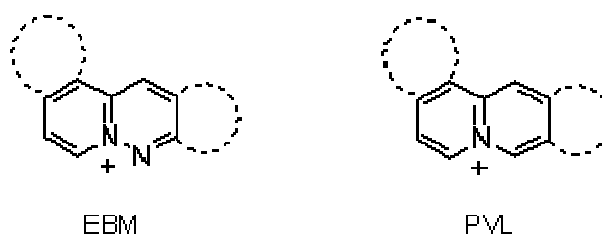
**Figura 13.** Actividad de los compuestos en células THP- 1 diferenciadas a macrófagos e infectadas con amastigotes. A: Porcentaje de macrófagos THP-1 que muestran fluorescencia verde tras 96 horas de tratamiento con DMSO (Control), edelfosina 1  $\mu\text{M}$ , compuesto **2** 3  $\mu\text{M}$  o compuesto **4** 3  $\mu\text{M}$ . La fluorescencia verde es debida a la presencia dentro de los macrófagos de amastigotes de *L. infantum* que expresan la eGFP. B: Intensidad media de fluorescencia (IMF) verde de las células THP-1 que todavía contienen amastigotes que expresan eGFP, tras 96 horas de tratamiento con DMSO (Control), edelfosina 1  $\mu\text{M}$ , compuesto **2** 3  $\mu\text{M}$  o compuesto **4** 3  $\mu\text{M}$ . La IMF es proporcional a la cantidad de amastigotes de *L. infantum* que hay dentro de las células.

Nuestros resultados indican que, mientras que el 16% de las células permanecen infectadas en los controles sin tratar, sólo el 2% de ellas permanecen infectadas tras el tratamiento con edelfosina (reducción del 87%) y el 6% (reducción del 62%) o el 13% (reducción del 19%) de ellas contienen parásitos tras el tratamiento con los compuestos **4** y **2** respectivamente. No se observó una reducción significativa con el resto de compuestos (datos no mostrados). Además, el número medio de parásitos dentro de las células que se mantienen infectadas tras el tratamiento se vio significativamente reducido en el caso del compuesto **2** (26% de reducción) y del compuesto **4** (35% de reducción), llegando este último a los mismos niveles de reducción en la carga parasitaria que las células tratadas con edelfosina, tal y como se deduce de la similar disminución en la intensidad de la fluorescencia celular (Fig. 13B).

### 1.3. Compuestos catiónicos derivados de los sistemas de azaquinilizinio y quinolizinio.

Como ya hemos comentado, algunos de los agentes antiprotozoíticos más efectivos se desarrollaron originalmente como fármacos antitumorales<sup>191, 192</sup> siendo el ejemplo más claro el de la miltefosina<sup>56, 57, 193</sup>. Aprovechando el sistema de cribado de alto rendimiento puesto a punto en el laboratorio, planteamos una colaboración con el grupo del doctor Juan José Vaquero del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Alcalá, que posee más de 20 años de experiencia en la síntesis de compuestos con distinto interés farmacológico, destacando entre ellos los heterociclos con propiedades antitumorales.

En el momento de escritura de la presente tesis doctoral, se está tramitando la solicitud de la patente para el uso de algunos de los compuestos evaluados como fármacos anti-*Leishmania*, por lo que no es posible incluir en esta memoria la estructura completa de dichos compuestos, sino sólo un pequeño esquema de las sales de azaquinilizinio (EBM) y quinolizinio (PVL) que se evaluaron:



**Figura 14.** Esquema estructural de las sales de azaquinilizinio (EBM) y quinolizinio (PVL).

A la hora de realizar el cribado de esta batería de moléculas, inicialmente se evaluó su actividad frente a promastigotes de *L. infantum* ensayando tres concentraciones de cada fármaco 1.0, 5.0 y 25.0  $\mu\text{M}$

**Tabla 5.** Actividades *in vitro* de los compuestos frente a promastigotes de *L. infantum* expresada en inhibición del crecimiento (%) a las 24 horas.

Compuesto	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	Compuesto	25 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M
EBM-007	SE*	-	-	EBM-24	87.4	68.2	58.0
EBM-T9	97.9	97.3	49.1	EBM-54	71.3	33.0	16.3
EBM-T35b	SE	-	-	EBM-T60	98.8	66.0	11.0
EBM-T47b	SE	-	-	EBM-71a	87.8	63.2	45.5
EBM-51	40.4	27.6	11.6	EBM-T71f	42.5	17.8	3.8
EBM-T59	40.8	14.3	SE	EBM-T76h	82.7	42.5	17.2
EBM-70a	99.5	92.6	34.8	EBM-T78d	85.8	43.5	39.1
EBM-78a	65.6	52.8	9.8	EBM-T78e	16.9	2.1	-
EBM-82a	34.0	15.6	SE	EBM-82b	33.3	26.0	11.3
EBM-T83b	39.6	14.9	0.6	EBM-T82c	99.2	76.7	21.4
EBM-455	81.8	28.9	4.6	EBM-T93	39.6	13.6	4.6
EBM-863	97.0	87.4	40.2	EBM-348	89.5	65.6	19.8
EBM-F23	42.6	17.2	3.2	EBM-349	89.3	61.0	32.4
EBM-F32	42.8	17.6	2.3	EBM-352	89.5	51.0	31.9
EBM-F41	99.1	93.5	84.8	EBM-353	72.2	36.1	27.9
EBM-F002	90.6	81.3	77.0	EBM-354	85.1	61.2	39.6
EBM-F003	81.8	64.0	14.7	EBM-355	96.8	95.4	94.5
EBM-002	99.6	99.3	98.2	PVL-134	98.6	91.8	28.0
EBM-011	99.3	45.6	10.0	PVL-139	SE	-	-
EBM-012	SE	-	-	PVL-141	71.7	32.1	1.8
EBM-23	85.2	53.0	24.6				

\* SE: Sin efecto.

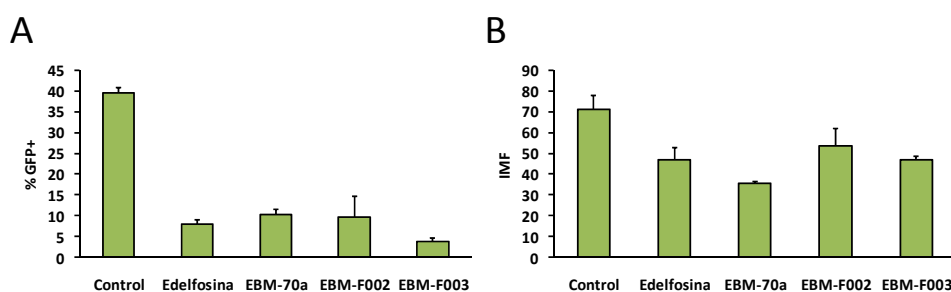
De los 41 compuestos evaluados, 26 producen una inhibición del crecimiento superior al 50% a una concentración de 25  $\mu$ M, 19 de estos la mantienen a 5  $\mu$ M y 4 de ellos a 1  $\mu$ M. La actividad de estos 26 compuestos fue evaluada frente a amastigotes de *L. infantum* y, para determinar su citotoxicidad, frente a las líneas celulares humanas Jurkat (linfocitos) y THP-1 (monocitos). Se utilizaron edelfosina y miltefosina como fármacos de referencia. Para el cálculo de los valores de IC<sub>50</sub> a las 24 horas, se probó cada compuesto con cada línea celular a cinco concentraciones diferentes 0.04, 0.2, 1.0, 5.0 y 25.0  $\mu$ M.

**Tabla 6.** Valores de IC<sub>50</sub> ± DE (μM) de los compuestos más activos para promastigotes y amastigotes de *L. infantum* y citotoxicidad frente a células Jurkat y THP-1.

Compuesto	Promastigote	Amastigote	Jurkat	IS	THP-1	IS
<b>EBM-T9</b>	1.5 ± 0.1	> 25.0	2.3 ± 0.5	-	6.7 ± 0.3	-
<b>EBM-70a</b>	2.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	11.3 ± 0.6	10	13.4 ± 0.7	12
<b>EBM-78a</b>	6.0 ± 0.2	14.7 ± 1.7	22.1 ± 1.2	1	> 25.0	-
<b>EBM-455</b>	13.0 ± 0.2	21.0 ± 1.0	23.6 ± 0.9	1	> 25.0	-
<b>EBM-863</b>	0.8 ± 0.1	0.1 ± 0.0	2.8 ± 0.4	28	2.6 ± 0.3	27
<b>EBM-F41</b>	0.6 ± 0.1	14.2 ± 2.2	6.4 ± 0.2	0	5.3 ± 0.5	-
<b>EBM-F002</b>	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0	> 25	> 147	4.2 ± 0.5	26
<b>EBM-F003</b>	5.3 ± 0.2	0.4 ± 0.0	9.2 ± 1.0	26	9.5 ± 1.2	27
<b>EBM-002</b>	0.5 ± 0.1	15.3 ± 1.4	0.9 ± 0.1	-	2.9 ± 0.1	-
<b>EBM-011</b>	6.7 ± 1.0	14.0 ± 3.3	11.5 ± 0.3	1	20.5 ± 1.1	1
<b>EBM-23</b>	4.6 ± 0.5	4.0 ± 0.3	4.0 ± 0.2	1	3.4 ± 0.1	1
<b>EBM-24</b>	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	4.6 ± 0.4	12	0.1 ± 0.0	-
<b>EBM-54</b>	13.9 ± 1.4	11.1 ± 1.5	4.8 ± 0.3	-	0.6 ± 0.0	-
<b>EBM-T60</b>	4.2 ± 0.3	3.0 ± 0.5	8.8 ± 1.5	3	5.9 ± 1.4	2
<b>EBM-71a</b>	2.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	> 25.0	> 147	0.2 ± 0.0	-
<b>EBM-T76h</b>	8.8 ± 1.3	0.7 ± 0.1	15.8 ± 0.6	21	13.0 ± 1.6	17
<b>EBM-T78d</b>	8.1 ± 1.2	> 25.0	12.9 ± 1.3	-	13.3 ± 0.4	-
<b>EBM-T82c</b>	3.1 ± 0.3	> 25.0	2.9 ± 0.3	-	2.7 ± 0.1	-
<b>EBM-348</b>	4.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	20.6 ± 1.3	30	16.5 ± 0.6	24
<b>EBM-349</b>	3.4 ± 0.2	1.7 ± 0.1	4.8 ± 0.3	3	0.1 ± 0.0	-
<b>EBM-352</b>	4.7 ± 0.2	0.1 ± 0.0	21.0 ± 2.7	234	0.1 ± 0.0	1
<b>EBM-353</b>	12.8 ± 1.8	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1	4	0.6 ± 0.1	4
<b>EBM-354</b>	2.9 ± 0.3	0.7 ± 0.1	23.1 ± 1.3	34	0.1 ± 0.0	-
<b>EBM-355</b>	0.2 ± 0.1	> 25.0	> 25.0	-	0.1 ± 0.0	-
<b>PVL-134</b>	2.4 ± 0.1	> 25.0	3.2 ± 0.2	-	4.5 ± 0.5	-
<b>PVL-141</b>	16.3 ± 0.9	> 25.0	13.5 ± 1.0	-	12.9 ± 0.1	-
<b>Edelfosina</b>	3.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	12.2 ± 2.4	15	5.0 ± 0.2	6
<b>Miltefosina</b>	15.0 ± 0.8	2.8 ± 0.1	48.2 ± 4.8	17	18.5 ± 0.6	7

En el caso de las células Jurkat, los mejores IS son los obtenidos para los compuestos **EBM-352** > **EBM-F002**, **EBM-71a** > **EBM-354** > **EBM-348** > **EBM-863** > **EBM-F003** > **EBM-T76h** > **EBM-24** > **EBM-70a**, mientras que para las THP-1 son **EBM-863**, **EBM-F003** > **EBM-F002** > **EBM-348** > **EBM-T76h** > **EBM-70a**. Todos éstos presentan mejores IS que miltefosina y edelfosina para Jurkat y THP-1 a excepción de los compuestos **EBM-70a** y **EBM-24** para el caso de las células Jurkat.

La actividad leishmanicida de las diez moléculas más activas fue evaluada, mediante citometría de flujo, en macrófagos infectados. Macrófagos THP-1 infectados con amastigotes de *L. infantum* que expresan la eGFP fueron tratados con dichos compuestos durante 48 horas. De éstos, sólo los compuestos **EBM-70a**, **EBM-F002** y **EBM-F003** demostraron tener una actividad leishmanicida en macrófagos infectados. Las células infectadas se identificaron por la fluorescencia verde emitida por sus amastigotes intracelulares.



**Figura 15.** Actividad de las mejores sales de azaquinilizinio en macrófagos THP-1 infectados con amastigotes. A: Porcentaje de macrófagos THP-1 mostrando fluorescencia verde tras 48 horas de tratamiento con DMSO, edelfosina 3 $\mu$ M, compuesto **EBM-70a** 3 $\mu$ M, compuesto **EBM-F002** 3 $\mu$ M o compuesto **EBM-F003** 3 $\mu$ M. La fluorescencia verde es debida a la presencia dentro de los macrófagos de amastigotes de *L. infantum* expresando la eGFP. B: Intensidad media de fluorescencia (IMF) verde de los macrófagos THP-1 que contienen amastigotes expresando eGFP, tras 48 horas de tratamiento con DMSO (C), edelfosina 3 $\mu$ M (E), compuesto **EBM-70a** 3 $\mu$ M, compuesto **EBM-F002** 3 $\mu$ M o compuesto **EBM-F003** 3 $\mu$ M. La IMF es proporcional a la cantidad de amastigotes de *L. infantum* que hay dentro de las células.

Nuestros resultados indican que, mientras que casi el 40% de las células permanecen infectadas en los controles sin tratar, sólo el 8% de ellas permanecen infectadas tras el tratamiento con edelfosina lo que equivale a una caída en la infección del 80%, mientras que con los compuestos **EBM-70a**, **EBM-F002** y **EBM-F003** la reducción en la infección es del 74, 76 y 90% respectivamente (Fig. 15A). No se observó una reducción significativa con el resto de compuestos (datos no mostrados). Además, el número medio de parásitos dentro de las células que se mantienen infectadas se reduce significativamente tras el tratamiento con el compuesto **EBM-70a** (50% de reducción), **EBM-F003** (34% de reducción) y **EBM-F002** (25% de reducción), siendo los dos primeros tanto o más efectivos que la edelfosina (34% de reducción), como se observa por la disminución de la intensidad de la fluorescencia celular (Fig. 15B). No se observó toxicidad alguna de los compuestos en los macrófagos infectados o en los controles sin infectar.

## 2. Inhibición de la dimerización de la TryR de *L. infantum*.

En el momento en el que se empezó a realizar el trabajo de la presente tesis doctoral, no se había caracterizado la estructura de la TryR de *L. infantum*, por lo que en primer lugar se construyó un modelo por homología y se empezó a trabajar en base al mismo.

### 2.1. Modelado por homología de la TryR de *L. infantum*.

Para la construcción del modelo se utilizó como molde la estructura, determinada por difracción de rayos X, de la TryR de *Crithidia fasciculata* (PDB id. 1FEC) que presenta un 78,8 % de homología de secuencia con la de *L. infantum* (fig. 16).

```

Lininfantum      MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAAVTHKKKVAVVDVQATHGPPPLFAALGGTCVNVGCVPK 60
Cfasciculata    MSRAYDLVVLGAGSGGLEAGWNAASLHKKRVAVIDLQKHHGPPHYAALGGTCVNVGCVPK 60
                *****:*****          ***:***:* *   **** ;*****

Lininfantum      KLMVTGAQYMDLIRESSGFGWEMDRESLCPNWKTLIAAKNKVNSINESYKSMFADTEGL 120
Cfasciculata    KLMVTGANYMDTIRESSAGFGWELDRESVRPNWKALIAAKNKAVSGINDSYEGMFADTEGL 120
                *****:***  ****,****:****: ****:*****.*. **: **: *****

Lininfantum      SFHMGFGALQDAHTVWVKSEDPHSDVLETLDTEYIL IATGSWPTRLGVPGEFCITSNE 180
Cfasciculata    TFHQGFGALQDNHTVLRVESADPNSAVLETLDTEYILLATGSWPQHLGIEGDDL CITSNE 180
                .* ***** **:*:* * **:* *****:***** :**: **:*:*****

Lininfantum      AFYLEDAPKRMLCVGGGYIAVEFAGIFNGYKPCGGYV DLCYRGDLILRGFDTEVRKSLTK 240
Cfasciculata    AFYLDEAPKRALCVGGYISIEFAGIFNAYKARGGQVD LAYRGDMILLRGFDELKRLQLTE 240
                *****:**** *****:*****.*. ** ***.****:*****:*:**:***

Lininfantum      QLGANGIRVRTNLMPTKITKNEDGSMHVHFN DGTEDYDQVMLAIGRVPRSQALQLDKAG 300
Cfasciculata    QLRANGINVRTHEMPAKVTKNADGTRHVVFESGAEAD YDVMMLAIGRVPRSQTLQLEKAG 300
                ** ****.***: **:*:*** **:*.* *:.* * ** *****:***:***

Lininfantum      VRTGKNGAVQVDAYSKTSVDNIIYAIGDVTNRV MLTPVAINEGAAFVETVFGGKPRATDHT 360
Cfasciculata    VEVAKNGAIVKVDAYSKTINVDNIIYAIGDVTDRV MLTPVAINEGAAFVDTV FANKPRATDHT 360
                *..****:*****.*****:*****:***.*****

Lininfantum      KVACAVFSIPPICGTEEEAAKNYETVAVYASSFT PLMHNISGSKHKEFMIRIITNES 420
Cfasciculata    KVACAVFSIPPMGVCGYVEEDAARKYDQVAVYESS FTPLMHNISGSTYKFMVRIVTNHA 420
                *****:*. ** .**:*:*: * **** *****:.*:**:***:***:

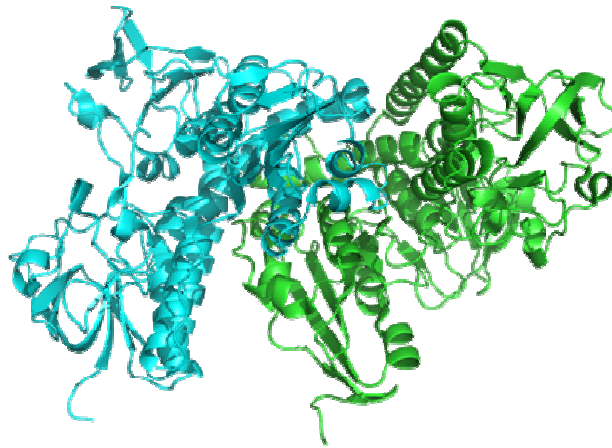
Lininfantum      NGEVLGVHMLGDSAPEIIQSVGICMKGAKISDFH STIGVHPTSAEELCSMRTPAYFYES 480
Cfasciculata    DGEVLGVHMLGDSPEIIQSVaicLKGAKISDFYNT IGVHPTSAEELCSMRTPAYFYEK 480
                :*****:*****.*:*****:*****:*****

Lininfantum      GKRVEKLSSNL 491
Cfasciculata    GKRVEKIDSNL 491
                *****:***

```

**Figura 16.** Alineamiento de secuencia entre la TryR de *L. infantum* y la de *C. fasciculata* realizado con CLUSTALW2<sup>170</sup> (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Para construir el modelo de la TryR se utilizó el programa SWISS-MODEL<sup>171, 172</sup> (fig. 17).



**Figura 17.** Modelo por homología de la TryR de *L. infantum* basado en la enzima de *C. fasciculata* (PDB id.1FEC). Los dos monómeros o cadenas polipeptídicas que conforman la estructura nativa aparecen coloreados en azul y verde.

## 2.2. Predicción de *hot-spots* de dimerización.

La energía libre de unión que describe la asociación proteína-proteína del dímero de TryR es la diferencia entre la energía libre,  $G$ , del dímero y la de la suma de los respectivos monómeros:

$$\Delta G_{\text{unión}} = G_{\text{dímero}} - (G_{\text{monómero}} + G_{\text{monómero}})$$

El valor de  $G$  para cada especie puede descomponerse en los siguientes términos:

$$G = E_{\text{gas}} + G_{\text{sol}} - TS$$

$$E_{\text{gas}} = E_{\text{int}} + E_{\text{ele}} + E_{\text{vdw}}$$

$$E_{\text{int}} = E_{\text{enlace}} + E_{\text{ángulo}} + E_{\text{torsión}}$$

$$G_{\text{sol}} = G_{\text{GB}} + G_{\text{no-polar}}$$

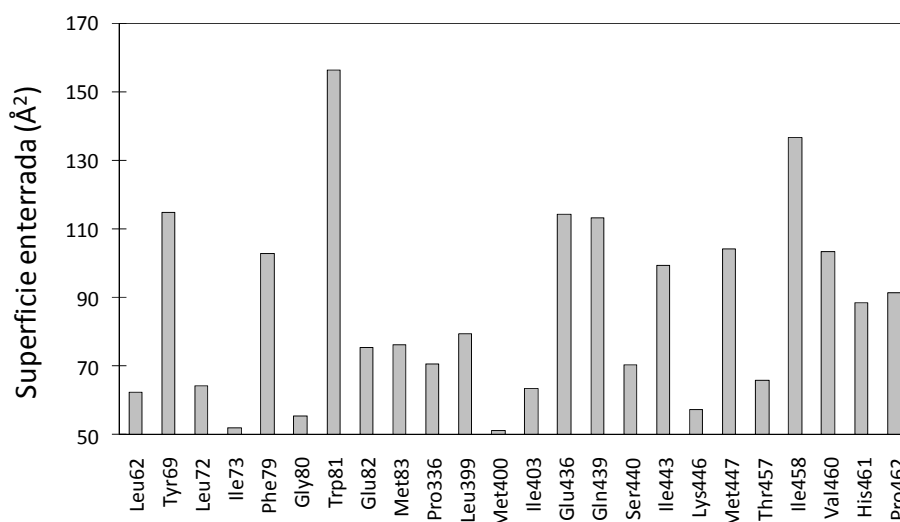
$$G_{\text{no-polar}} = \gamma \text{ SASA}$$



Donde  $E_{\text{gas}}$  es la energía en fase gas calculada usando el campo de fuerzas de AMBER, *Assisted Model Building with Energy Refinement*,<sup>194</sup> como la suma de la energía interna ( $E_{\text{int}}$ ), que a su vez se descompone en la suma de la energía de enlaces ( $E_{\text{enlace}}$ ), ángulos de enlace ( $E_{\text{ángulo}}$ ) y ángulos diedros ( $E_{\text{torsión}}$ ), más las energías no enlazadas tanto coulombicas ( $E_{\text{ele}}$ ) como de van der Waals ( $E_{\text{vdw}}$ ). La energía de solvatación ( $G_{\text{sol}}$ ) se descompone en contribuciones polares y no polares. La contribución polar ( $G_{\text{GB}}$ ) se calcula resolviendo la ecuación de Born<sup>195</sup>, mientras que la contribución apolar se estima a partir de la superficie accesible al disolvente, SASA<sup>196</sup>.  $\gamma$  es la constante de la tensión superficial. T y S son la temperatura y la entropía respectivamente. S se calcula habitualmente haciendo uso de la estadística clásica y análisis de los modos normales de instantáneas representativas y previamente minimizados de una trayectoria de dinámica molecular, pero en una primera aproximación, este término no se comprobó en nuestro análisis.

### 2.2.1. Cálculo de la superficie accesible al disolvente (SASA).

Se realizó utilizando el programa NACCESS<sup>173</sup> (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/>), que calcula la superficie accesible para ácidos nucleicos y proteínas. Mediante el cálculo de las diferencias en SASA entre dímero y monómeros por separado, da una medida de la superficie enterrada para cada residuo (fig. 18).



**Figura 18.** Área de la superficie accesible al solvente (SASA) enterrada por residuo.

## 2.2.2. Cálculo de la contribución electrostática y de van der Waals.

Mediante el programa AMBER (<http://ambermd.org/>), se calcularon las contribuciones energéticas individuales, tanto electrostáticas (fig. 19) como de van der Waals (fig. 20) a la energía de dimerización de la TryR.

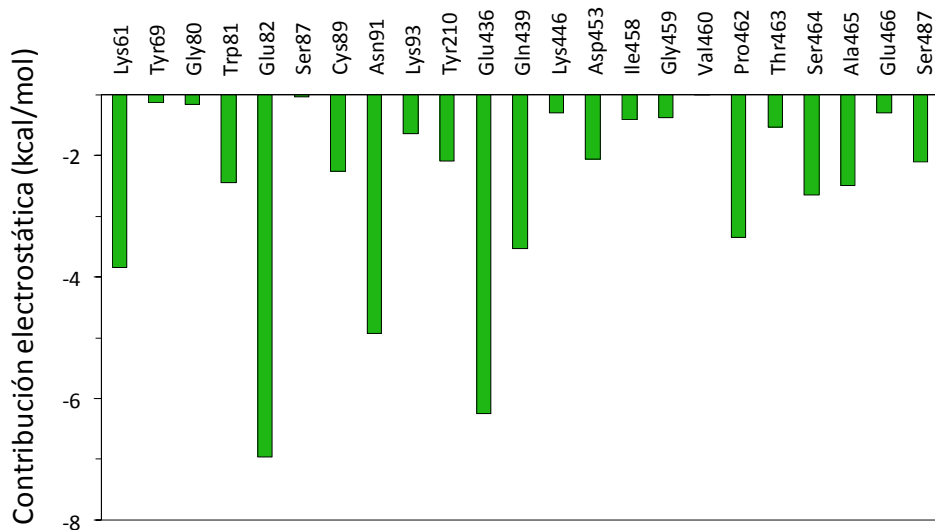


Figura 19. Residuos con mayor contribución electrostática a la energía de dimerización de la TryR.

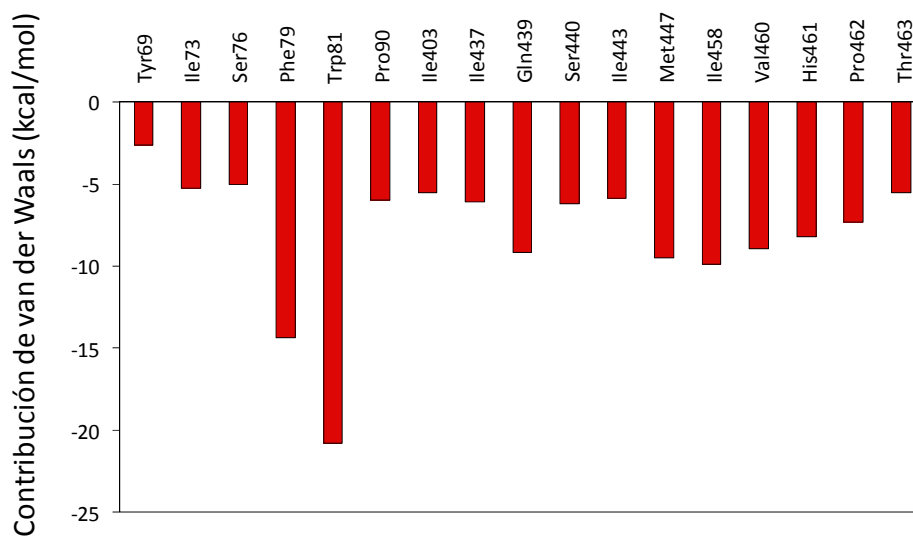


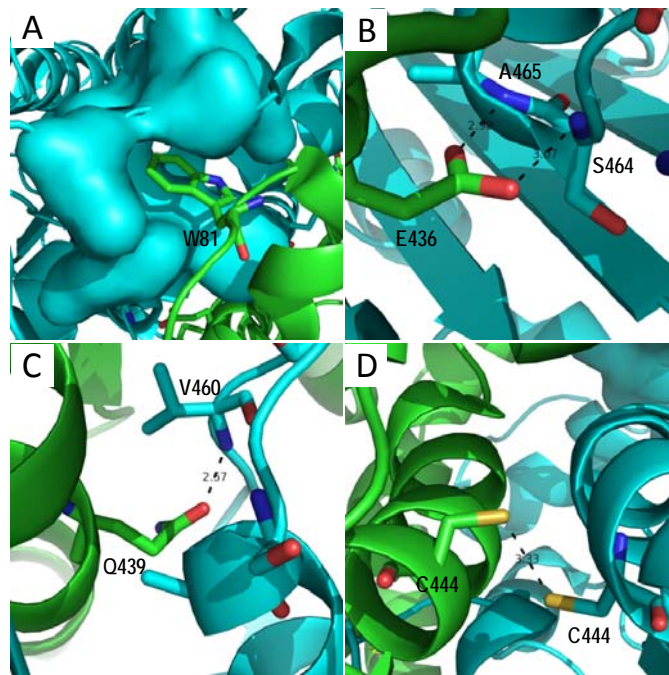
Figura 20. Residuos con mayor contribución de v. der Waals a la energía de dimerización de la TryR.

Se observó que hay tres residuos que destacan simultáneamente en dos de los tres parámetros estudiados (tabla 1) por lo que, a priori, parecen claves para la dimerización de la TryR. Son el triptófano 81 (W81), el glutámico 436 (E436) y la glutamina 439 (Q439).

**Tabla 7.** Residuos que contribuyen en mayor medida a la energía de dimerización de la TryR.

Residuo	SASA enterrada	Contribución electrostática	Contribución de van der Waals
Y69	*		
F79			*
W81	*		*
E82		*	
N91		*	
E436	*	*	
Q439	*	*	
I458	*		

El W81 interacciona con un nicho apolar formado por Y69, M70, I73, L88, P90, G209 y Y210 del otro monómero (fig. 21A). El carboxilo del E436 interacciona mediante puentes de hidrógeno con los NH de S464 y A465 del esqueleto polipeptídico del otro monómero (fig. 21B). Además, el CO de la Q439 interacciona con el NH de la V460 (fig. 21C). Cabe destacar la disposición de las C444 en ambos monómeros, puesto que se encuentran enfrentadas y a una distancia que podría sugerir la existencia de un puente disulfuro intermolecular (fig. 21D).



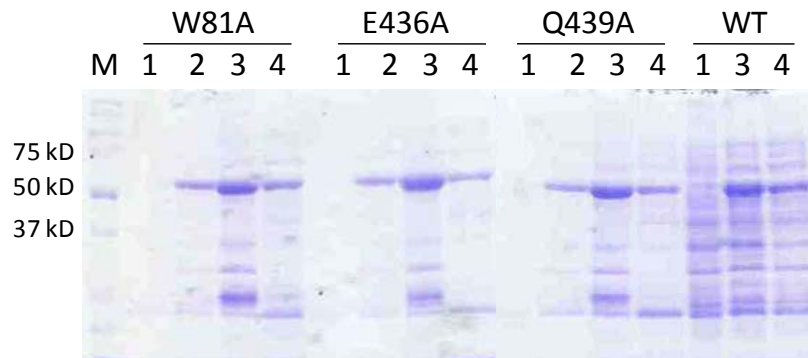
**Figura 21.** Detalle de residuos considerados clave para la dimerización de la TryR. Cada monómero aparece coloreado en verde y azul respectivamente. Los átomos de O se marcan en rojo, los N en azul y los S en amarillo. Así mismo se indican distancias de enlace (Å) en color negro. Figuras generadas con PyMOL.

### 2.3. TryR silvestre y generación de mutantes de la TryR. Expresión y purificación.

En primer lugar, la secuencia codificante de la TryR fue amplificada mediante PCR, tomando como molde el ADN genómico de nuestra cepa de *L. infantum*. El producto de PCR fue purificado, doblemente digerido con las endonucleasas de restricción BamH I y Hind III y clonado en el vector de expresión de proteínas pRSET A digerido con las mismas endonucleasas.

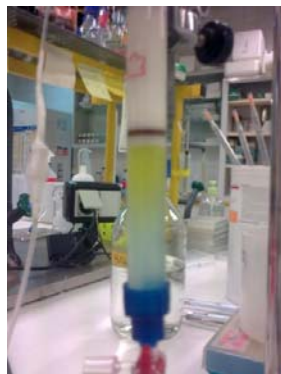
Con objeto de determinar la importancia de los tres residuos que parecen contribuir en mayor medida a la energía de dimerización de la TryR, se utilizaron técnicas de mutagénesis dirigida para crear tres mutantes, una por cada residuo, en las que cada uno de ellos se sustituyó por una alanina. Las mutantes generadas se denominan W81A, E436A y Q439A. La secuencia de ADN codificante para cada una de las formas recombinantes fue clonada en el vector de expresión pRSET A y transformado en la

cepa de expresión de proteínas BL21 (DE3) pLysSs, donde se determinaron las condiciones óptimas para la expresión y solubilidad de la proteína silvestre (WT) y las respectivas mutantes (fig. 22).

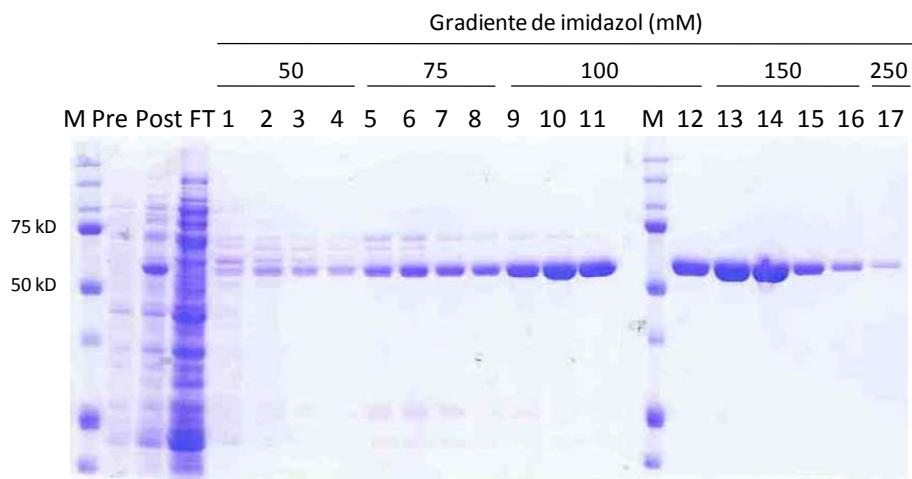


**Figura 22.** Test de expresión y solubilidad de TryR WT y las mutantes W81A, E436A y Q439A. M: marcador de pesos moleculares; 1: preinducción; 2: postinducción (1mM IPTG, temperatura ambiente, 16h); 3: fracción insoluble; 4: fracción soluble. PM (TryR) = 53 kDa.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de expresión, se pasó a purificar cada proteína mutante en un cultivo de 0.4L de bacterias. La purificación se realizó en condiciones nativas y mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de sefarosa acoplada a ácido nitrilotriacético-níquel (Ni-NTA) en la que quedan retenidas las proteínas mediante la cola de 6 histidinas o His-*tag* que se les incorpora durante su expresión en el vector pRSET A. La elución de las mismas se realizó utilizando un gradiente de imidazol, analizándose cada una de las fracciones en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (fig. 24). La purificación pudo seguirse desde un punto de vista macroscópico ya que cada dímero de TryR nativa une dos moléculas de FAD, que es de color amarillo en solución (fig. 23).



**Figura 23.** Columna de cromatografía cargada con resina de sefarosa-Ni-NTA de color azul y TryR WT de tonalidad amarilla por las moléculas de FAD.



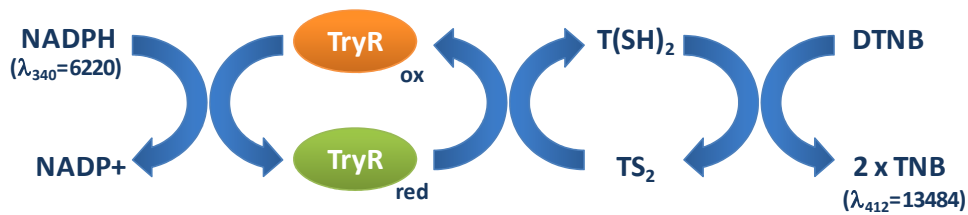
**Figura 24.** Gel teñido con azul de Coomasie correspondiente a la electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las fracciones obtenidas en la purificación de TryR WT. Pre: preinducción; Post: postinducción; FT: *Flow Through* (lisado que no se une a la columna).

Del mismo modo se purificaron las 3 mutantes, obteniéndose perfiles de elución análogos (datos no mostrados).

Las fracciones más puras se combinaron, concentraron con un Amicon de 30kDa de *cut-off* donde se sustituyó el tampón en el que estaban contenidas para eliminar el imidazol, obteniéndose del orden de 10 mg de proteína TryR pura por cada 400 mL de cultivo inicial.

#### 2.4. Ensayo de actividad de TryR WT y mutantes W81A, E436A y Q439A.

Los ensayos de actividad de la TryR han estado históricamente limitados desde el punto de vista económico dado el elevado precio del tripanotión oxidado (TS<sub>2</sub>), sustrato natural de la TryR; debido a esto, se planteó<sup>175</sup> un ensayo en el que la reducción del mismo por parte de la TryR, se acopla a la reducción del ácido ditionitrobenzónico (DTNB) a ácido 2-nitro-5-mercaptobenzónico (TNB). En estas condiciones el tripanotión reducido [T(SH)<sub>2</sub>] producido por la TryR se oxida rápidamente regenerándose de nuevo TS<sub>2</sub>, manteniendo así constante la concentración de sustrato y evitando desviaciones en la linealidad de la velocidad de reacción debidas al agotamiento del mismo (fig. 25).

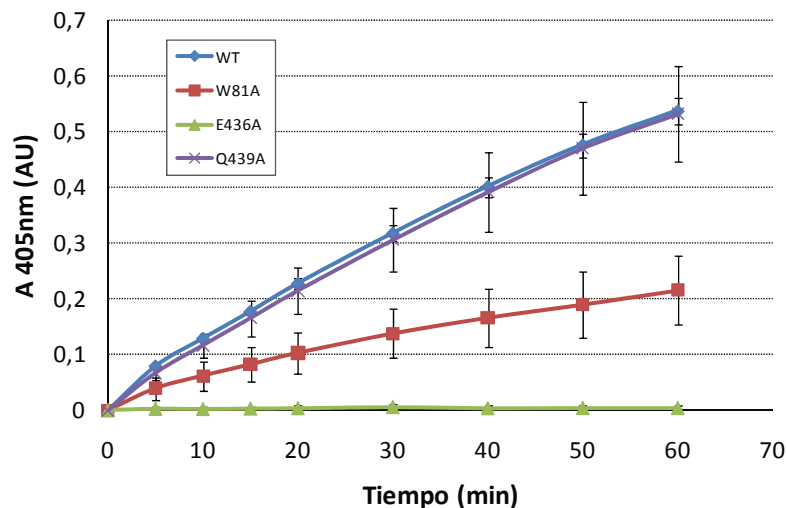


**Figura 25.** Ensayo de actividad de la TryR acoplado a DTNB. La TryR toma el poder reductor del NADPH oxidándolo, reduce el TS<sub>2</sub> a T(SH)<sub>2</sub> y este vuelve a la forma oxidada por acción del DTNB.

Dado que el TNB es un compuesto coloreado, con un coeficiente de extinción molar de  $13484 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 412 nm, el progreso de la reacción puede seguirse fácilmente analizando la absorbancia de la solución a 412 nm.

Tradicionalmente el progreso de la reacción de reducción del tripanotión oxidado se ha seguido mediante el análisis de la caída de la absorción a 340 nm debida a la oxidación de NADPH, que tiene un coeficiente de extinción molar de  $6200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Mientras que por cada molécula de TS<sub>2</sub> que se reduce, sólo se oxida un equivalente de NADPH, en el conjunto de reacciones acopladas que constituyen nuestro ensayo por la misma molécula de TS<sub>2</sub> se generan dos de TNB. Dadas las diferencias estequiométricas y de los coeficientes de absorción molar de cada cromóforo, al medir la actividad de la TryR mediante la aparición del TNB, la sensibilidad del ensayo se multiplica por cuatro.

La actividad de la proteína silvestre y de las tres formas mutantes se determinó mediante un ensayo enzimático con TryR 7.5 nM (WT, W81A, E436A o Q439A), HEPES 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NADPH 0.15 mM y DTNB 25 μM en el que se disparó la reacción adicionando TS<sub>2</sub> 1 μM. Se siguió el curso de la misma registrando la absorbancia a 405 nm durante una hora (fig. 26).



**Figura 26.** Ensayo de actividad de TryR para la proteína WT y las mutantes W81A, E436A y Q439A.

Se observó que la mutante Q439A no ve prácticamente afectada su actividad con respecto a la proteína silvestre, la W81A pierde parte de la actividad y la E436A resulta prácticamente inactiva.

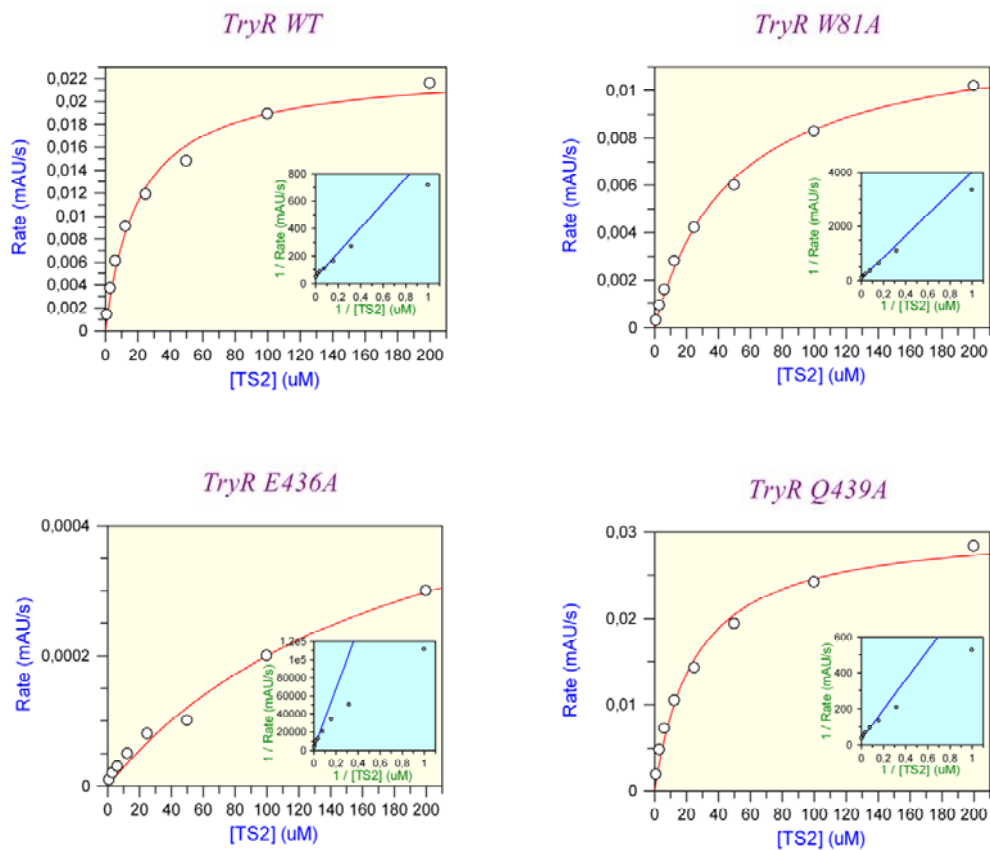
### 2.5. Estudio cinético de las reacciones catalizadas por TryR WT y las mutantes W81A, E436A y Q439A.

Se realizaron experimentos de actividad enzimática (fig. 12) con distintas concentraciones de  $TS_2$  ( $5 \mu M$ ,  $15.625 \mu M$ ,  $31.25 \mu M$ ,  $62.5 \mu M$ ,  $125 \mu M$ ,  $250 \mu M$ ,  $500 \mu M$  y  $1 mM$ ) para determinar los parámetros cinéticos de *constante de Michaelis-Menten* ( $K_m$ ) y *velocidad máxima* ( $V_{max}$ ). La  $V_{max}$  de una enzima es la velocidad máxima en la formación de producto, velocidad constante que se alcanzaría en condiciones saturantes de sustrato. La  $K_m$  es la concentración de sustrato a la que se alcanza una velocidad que es la mitad de la  $V_{max}$ . Se puede aplicar Michaelis-Menten porque en todo momento, en la escala de tiempo analizada, la concentración de sustrato es mucho mayor que la de la enzima y la concentración del complejo enzima-sustrato puede considerarse constante. Además, es útil determinar una constante más general, el *número de recambio* ( $k_{cat}$ ), que se define como la cantidad de sustrato transformado por unidad de tiempo cuando la enzima está saturada del mismo. En el modelo de Michaelis-Menten  $k_{cat}$  equivale a  $k_2$ , es decir, a la velocidad con que la enzima transforma el complejo enzima-sustrato en producto. Para evaluar la



eficiencia catalítica de una enzima se determina la *constante específica*, que no es más que el cociente entre  $k_{cat}$  y  $K_m$ . El valor máximo de esta constante se alcanza en aquellas enzimas en las que el complejo enzima-sustrato sólo evoluciona en la dirección de formar producto y nunca revierte al estado de enzima + sustrato. Dicho de otra manera, cada vez que el enzima se encuentra con el sustrato lo transforma a producto. Este límite está controlado por los procesos de difusión de las moléculas y está en el rango de  $10^8$ - $10^9$   $M^{-1}\cdot s^{-1}$ . Por tanto, cuanto mayor sea el valor de  $k_{cat}/K_m$  menos reversible será el equilibrio de asociación entre enzima y sustrato. Podemos comprobar que la TryR está muy lejos de alcanzar la perfección catalítica.

Todos estos parámetros enzimáticos aparecen tabulados en la tabla 8.



**Figura 27.** Cinéticas enzimáticas de TryR WT, W81A, E436A y Q439A. Gráficos creados con GraFit 6.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos de TryR silvestre y mutantes.  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten.  $V_{max}$ : velocidad máxima de la reacción.  $k_{cat}$ : número de intercambio.  $k_{cat}/K_m$ : constante específica.

TryR	WT	W81A	E436A	Q439A
[TryR] ( $\mu\text{M}$ )	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	20,64	49,27	192,22	25,30
$V_{max}$ ( $\text{maU}\cdot\text{s}^{-1}$ )	0,0228	0,0125	0,0006	0,0308
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	30,22	16,57	0,80	40,83
$k_{cat}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	1,464	0,336	0,004	1,614
Ratio mutante / WT	1,000	0,230	0,003	1,102

Como podemos observar, la mutante W81A presenta un número de recambio de aproximadamente la mitad del valor de la proteína WT y una eficiencia catalítica 4 veces menor. Por el contrario, la Q439A tiene unos parámetros cinéticos bastante similares a los de la WT, indicando que la mutación de este residuo no parece afectar a la actividad enzimática. El caso más destacado es el de la E436A, ya que tiene un número de recambio casi 38 veces inferior al de la proteína silvestre y una eficiencia catalítica 366 veces más pequeña.

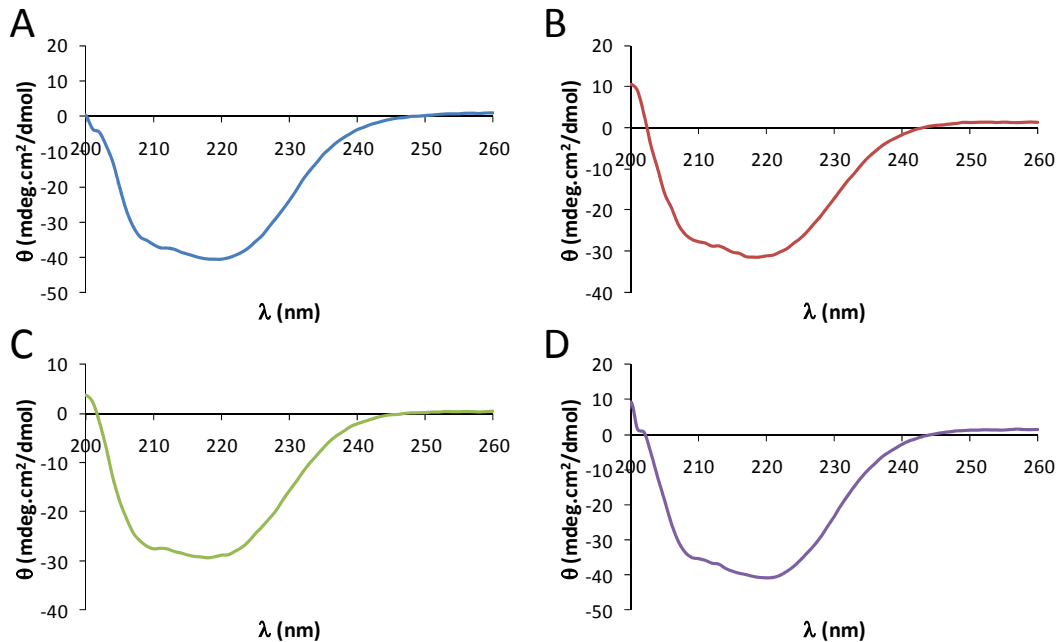
En conclusión, estamos en disposición de afirmar que el E436 es un residuo clave para la actividad enzimática de la TryR.

## 2.6. Estudio del plegamiento y oligomerización de TryR WT, W81A, E436A y Q439A.

Nuestros resultados confirman que el residuo E436 es clave para la actividad de la TryR, pero todavía no permiten determinar si la pérdida de actividad es debida a alteraciones en el proceso de dimerización de la proteína, a defectos en el plegamiento de la misma o a cambios en la estructura del centro activo. Debido a ello, se procedió a estudiar el plegamiento y el estado de oligomerización de la proteína silvestre y las respectivas mutantes.

### 2.6.1. Estudio del plegamiento: dicroísmo circular.

Para determinar si las mutaciones en la secuencia de la TryR producían algún cambio en el plegamiento de la misma, se realizaron experimentos de dicroísmo circular tanto para la proteína WT como para las 3 mutantes (fig. 28).



**Figura 28.** Espectros de dicroísmo circular de las distintas TryR (A: WT; B: W81A; C: E436A; D: Q439A). Los valores representados para cada proteína corresponden al promedio de 4 medidas independientes.

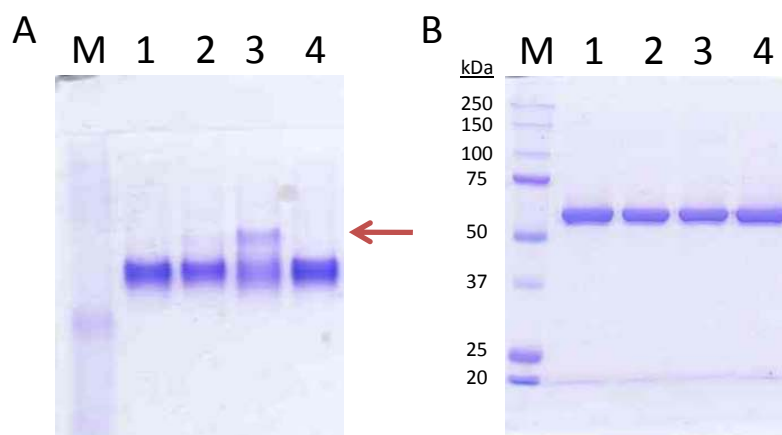
Se observó claramente que tanto la proteína silvestre como las tres mutantes están perfectamente plegadas y de la misma manera, ya que se observa el característico perfil de espectro de DC con los dos mínimos correspondientes a hélices  $\alpha$  en torno a 210 y 220 nm que es prácticamente idéntico para las cuatro proteínas.

### 2.6.2. Electroforesis de proteínas en condiciones nativas.

En una electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida, las proteínas se encuentran con una carga neta negativa debida al dodecilsulfato de sodio (SDS), por tanto la relación carga/masa es igual para todas las proteínas y estas

migran dentro del gel de poliacrilamida exclusivamente en función de la longitud de su cadena polipeptídica. Como las proteínas se tratan con un agente reductor, rompiéndose todos los puentes disulfuro que pueda haber y se desnaturalizan con calor, la TryR en estas condiciones migra como un único monómero de 53 kDa. Ahora bien, si la electroforesis se realiza en condiciones nativas sin SDS ni agentes reductores y sin hervir la muestra, la proteína se mantendrá en su estado nativo y su migración dependerá de la masa y forma de las especies existentes (monómero, dímero o agregado) y de la carga neta de las mismas.

Con objeto de determinar la posible distribución de cada proteína entre sus formas monomérica y dimérica, se realizaron dos tipos de electroforesis: una en condiciones nativas (fig. 29A) y otra en condiciones desnaturalizantes (fig. 29B) tanto para la proteína WT como para las mutantes W81A, E436A y Q439A.



**Figura 29.** Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie correspondientes a la electroforesis nativa (A) y en condiciones desnaturalizantes (B) de 5  $\mu$ g de TryR WT (1), W81A (2), E436A (3) y Q439A (4) respectivamente. La flecha roja indica la presencia de una banda extra para la E436A y la W81A, aunque más débil, respecto a la WT. M: Marcador de pesos moleculares.

En el gel correspondiente a la electroforesis en condiciones nativas (fig. 29A) se observa que mientras que sólo aparece una banda para las proteínas WT (carril 1) y Q439A (carril 4), hay una banda extra muy clara en la E436A (carril 3) que también se aprecia, aunque mucho más sutilmente en la W81A (carril 2). Cuantificando por densitometría y normalizando respecto a la única banda de la WT, la banda extra que se observa en la E436A constituye un 25% de la señal, mientras que la banda que migra a la altura de la de la WT representa el 75%. Para el caso de la mutante W81A,

la banda extra constituye el 5% del total de la proteína. Por otra parte, en el gel de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes se observa una única banda para todas las proteínas, lo que descarta la posibilidad de que alguna de ellas pueda haber sido digerida parcialmente (fig. 29B). Dado que los resultados obtenidos en los espectros de dicroísmo circular indican que no hay cambios sustanciales en la estructura de ninguna de las mutantes, parece razonable interpretar la existencia de una segunda banda con menor movilidad como la consecuencia de cambios en el estado de oligomerización.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la mutación en el E436 a alanina produce un cambio en el estado de oligomerización de la TryR.

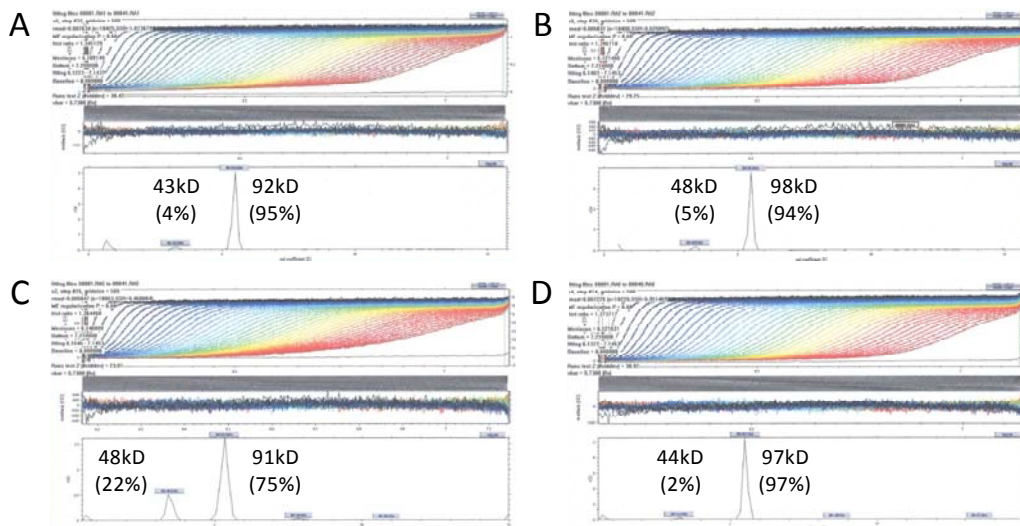
### 2.6.3. Ultracentrifugación analítica.

A la hora de caracterizar el estado de oligomerización de una proteína no basta con aplicar una única técnica. Una segunda opción perfectamente validada es el análisis mediante experimentos de ultracentrifugación analítica. Concretamente se realizaron dos tipos de experimentos:

- **Velocidad de sedimentación:** técnica hidrodinámica sensible a la masa y la forma. Se someten las muestras a un elevado campo centrífugo de tal manera que la fuerza de centrifugación es mayor que la de difusión, por lo que existe un transporte neto de material hacia el fondo de la celda. La migración de las proteínas va quedando registrada por una serie de medidas de absorbancia a distintas longitudes de onda y a intervalos regulares de tiempo. Las macromoléculas se fraccionan así en función de su coeficiente de sedimentación, una función de la masa, la densidad y la forma macromolecular. Este fraccionamiento es muy útil para detectar y cuantificar la estequiometría y la afinidad de complejos macromoleculares.
- **Equilibrio de sedimentación:** técnica termodinámica sensible exclusivamente a la masa. Se realiza a velocidades inferiores, donde se igualan las fuerzas opuestas de centrifugación y difusión (condición de equilibrio). En estas condiciones, las especies macromoleculares se distribuyen formando un gradiente de concentración que se caracteriza porque a) no varía con el tiempo, b) es independiente de las propiedades hidrodinámicas (forma) de las macromoléculas y c) depende únicamente de la masa molecular de la especie que sedimenta. Esta técnica permite la determinación de la masa molecular de las especies macromoleculares que sedimentan, así como la

detección y el análisis cuantitativo (en términos de estequiometría, afinidad y reversibilidad) de las asociaciones que dan lugar a la formación de complejos macromoleculares en disolución.

Se realizaron experimentos de velocidad de sedimentación para las cuatro proteínas a una concentración de 1.0 mg/mL y de equilibrio de sedimentación a tres concentraciones distintas, 0.2, 0.5 y 1.0 mg/mL, en todas ellas la densidad óptica a 230 nm de las proteínas se mantiene en el rango 0.2-0.5.



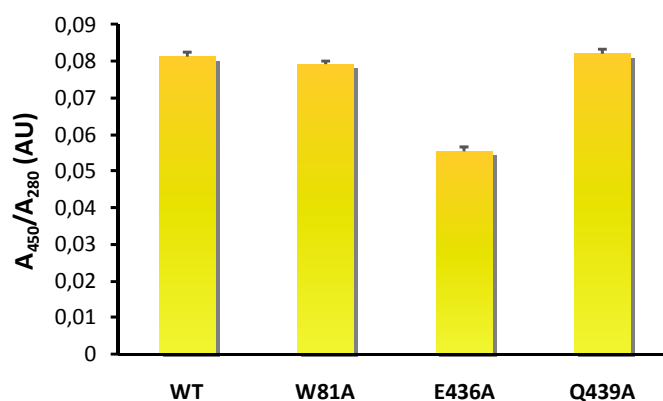
**Figura 30.** Experimentos de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica de TryR WT (A), W81A (B), E436A (C) y Q439A (D).

Los resultados del análisis de velocidad de sedimentación revelan que mientras que para las TryR WT, W81A y Q439A prácticamente la totalidad de la proteína está en forma de un dímero de unos 92-98 kDa y sólo hay en torno a un 4% de población monomérica, para la E436A el porcentaje de monómero es 5 veces mayor, alcanzando un 22% de la cantidad de proteína.

En este momento podemos afirmar que la mutación del E436 a alanina, está inhibiendo la dimerización de la TryR.

#### 2.6.4. Ensayo de unión de FAD.

En condiciones nativas la TryR es un dímero y cada monómero es capaz de unir una molécula de NADPH y otra de FAD. Teniendo en cuenta que la proteína debe estar en dicha conformación dimérica para que sea capaz de unir las moléculas de FAD, se puede hacer una estimación del estado de dimerización mediante un cálculo de la cantidad de FAD unido por unidad de masa de proteína basándonos tan sólo en datos obtenidos mediante espectroscopía. Se tomaron las proteínas TryR WT, W81A, E436A y Q439A purificadas y se midió la absorción de cada muestra a 280 nm (máximo de absorción de proteínas) y a 450 nm (máximo de absorción del FAD). La ratio entre dichas absorbancias nos da la cantidad de FAD unido para cada proteína (fig. 31).



**Figura 31.** Cantidad de FAD unido por cada una de las TryR calculado mediante el ratio  $A_{450}/A_{280}$ .

Mientras que las mutantes W81A y Q439A son capaces de unir la misma cantidad de FAD que la WT, la mutación en el E436 hace que la TryR sea capaz de unir un 30% menos de cofactor.

## **2.7. Profundización en el estudio de la dimerización de la TryR.**

### **2.7.1. Generación de nuevas mutantes de TryR.**

Hemos demostrado que en la dimerización de la TryR juegan un papel fundamental las interacciones no covalentes que se establecen entre el E436 de un monómero con el monómero complementario, pero cabe la posibilidad de que además exista una interacción covalente de tipo puente disulfuro entre las C444 de cada monómero (ver apartado 2.2.2.). Para elucidar si esto es así, nos propusimos generar una serie de mutantes de la TryR nuevas; además, nos planteamos generar una mutante nueva del E436 en la que cambiamos el residuo ácido por uno básico, lo que debería desestabilizar aún más el dímero que en el caso de la E436A.

C444S: cambio de la cisteína 444 por una serina en la TryR WT.

E436A/C444S: cambio de la cisteína 444 por una serina en la TryR E436A.

E436K: cambio del glutámico 436 por una lisina.

El proceso de mutagénesis dirigida, clonaje, expresión y purificación de las nuevas mutantes fue análogo al llevado a cabo para las anteriores (ver apdo. 2.3.), con el único inconveniente de que la E436K resulta ser una proteína mucho más insoluble que el resto; aún así se obtuvo suficiente cantidad como para poder ser purificada.

### **2.7.2. Caracterización enzimática de TryR E436K, C444S y E436A/C444S.**

La actividad enzimática de las nuevas mutantes se caracterizó (fig. 32) de forma similar a lo ya descrito anteriormente, determinándose sus distintos parámetros enzimáticos (tabla 9). En todo caso se tomó como referencia la proteína WT.



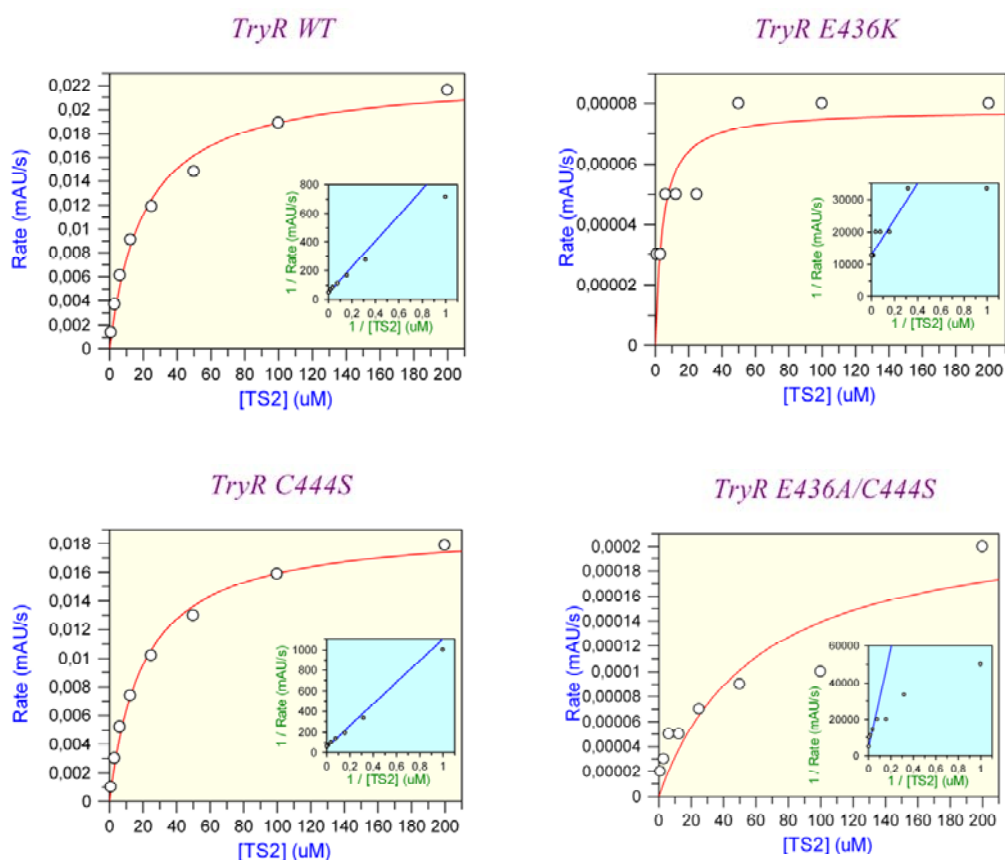


Figura 32. Cinéticas enzimáticas de TryR WT y mutantes E436K, C444S y E436A/C444S.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de TryR silvestre y mutantes E436A, E436K, C444S y E436A/C444S.  $K_m$ : constante de Michaelis-Menten.  $V_{max}$ : velocidad máxima de la reacción.  $k_{cat}$ : número de intercambio.  $k_{cat}/K_m$ : constante específica.

TryR	WT	E436A	E436K	C444S	E436A/C444S
[TryR] ( $\mu\text{M}$ )	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075	0,0075
$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	20,64	192,22	4,34	20,17	60,37
$V_{max}$ ( $\text{mAU}\cdot\text{s}^{-1}$ )	0,0228	0,0006	0,0001	0,0191	0,0002
$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	30,22	0,80	0,1	25,32	0,27
$k_{cat}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	1,464	0,004	0,024	1,255	0,004
Ratio mutante / WT	1,000	0,003	0,016	0,857	0,003

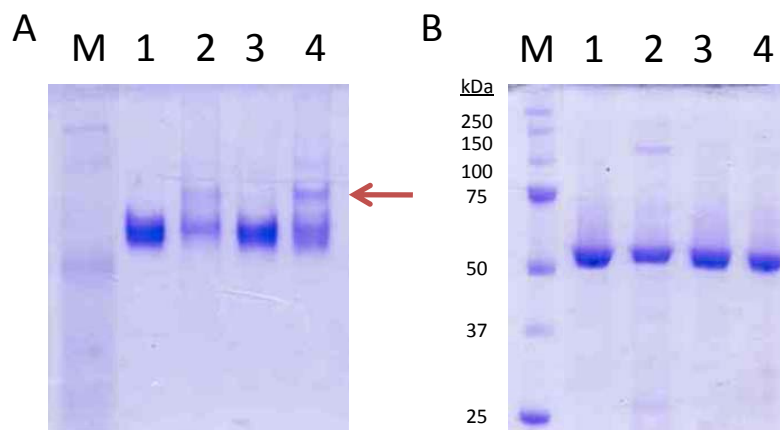
Lo primero que observamos es que el cambio del E436 por un residuo básico como es la lisina produce, como parecía lógico, una enzima mucho menos activa, con un nº de recambio 300 veces más pequeño que el de la proteína WT y una eficiencia catalítica 60 veces más pequeña.

Por otra parte, el cambio de la C444 a serina sólo parece afectar ligeramente a la actividad de la enzima, puesto que tanto su número de recambio como su eficiencia catalítica son muy similares a los de la TryR WT. Ahora bien, en el caso de la doble mutante, el añadir la mutación C444S a la E436A genera una TryR con la misma eficiencia catalítica, pero con un número de recambio aún más bajo, de menos de la mitad del observado para la E436A, lo que nos dice que la E436A/C444S es capaz de reducir menos de la mitad del tripanotión que reduce la E436A en el mismo tiempo.

### 2.7.3. Estudio del plegamiento y oligomerización de TryR E436K, C444S y E436A/C444S.

Previamente a los estudios de oligomerización de las nuevas mutantes, se comprobó mediante dicróismo circular que las tres estaban correctamente plegadas (datos no mostrados). Se procedió a estudiar el estado de oligomerización de cada una mediante las mismas técnicas empleadas anteriormente:

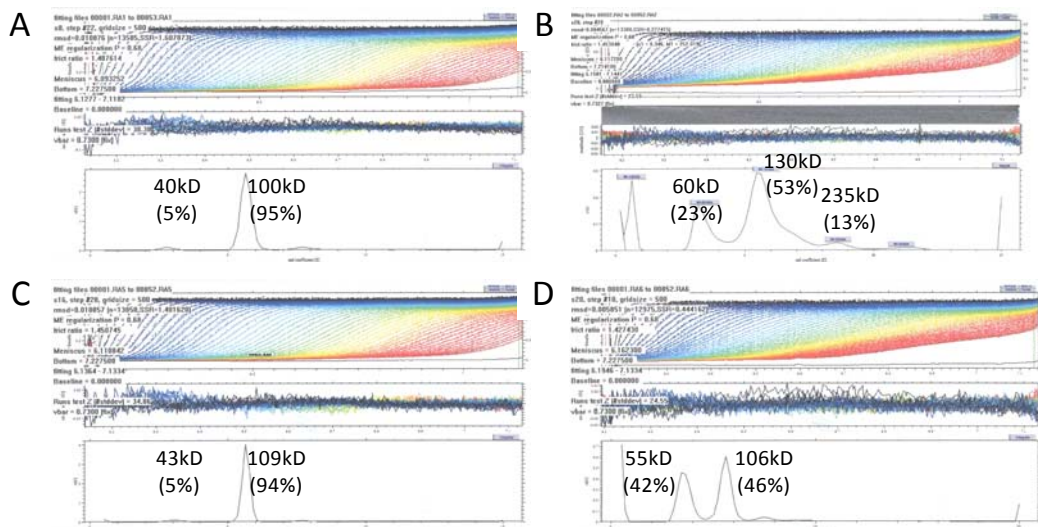
- Electroforesis de proteínas en condiciones nativas:



**Figura 33.** Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie correspondientes a la electroforesis nativa (A) y en condiciones desnaturizantes (B) de 5 µg de TryR WT (1), E436K (2), C444S (3) y E436A/C444A (4) respectivamente. La flecha roja indica la presencia de una banda extra para la E436K y la E436A/C444S. M: Marcador de pesos moleculares.

Se observó que la mutación del E436 a lisina (carril 2) sigue produciendo la aparición de la banda de proteína extra correspondiente al monómero de TryR, pero aparentemente no hace que haya una mayor cantidad que en caso de la E436A (figura 29, carril 3). La mutación de la C444 a serina (carril 3) no parece alterar el estado de oligomerización de la TryR ya que, al igual que en el caso de la WT (carril 1), aparece únicamente la banda correspondiente a la proteína dimérica. En el caso de la doble mutante E436A/C444S (carril 4) se mantiene el patrón de dos bandas correspondiente a monómero y dímero de TryR ya observado en la E436A. Al realizar la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, se observa que, en el carril correspondiente a la E436K, aparecen algunas bandas débiles de tamaño menor y mayor respecto al monómero de TryR, lo que podría estar hablando de degradación de la proteína y de la presencia de agregados supramoleculares difíciles de desnaturalizar.

- Ultracentrifugación analítica:



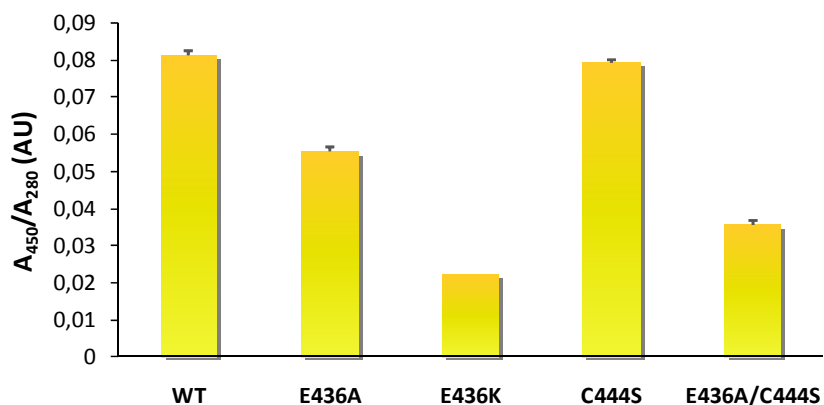
**Figura 34.** Experimentos de velocidad de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica de TryR WT (A), E436K (B), C444S (C) y E436A/C444S (D).

Se observó que, mientras que para las TryR WT (A) y C444S (C) prácticamente la totalidad de la proteína está en forma de un dímero de unos 100-109 kDa y sólo hay un 5% de población monomérica, para la E436K (B) el porcentaje de monómero es 4 veces mayor, alcanzando un 23% de la cantidad de proteína, pero además empiezan a aparecer agregados de mayor tamaño. Para el caso de la doble mutante (D) se

determinó que, si bien para la E436A tenemos un 22% de monómero, al añadir la mutación C444S la población monomérica prácticamente se duplica hasta alcanzar un 42% del total, quedando tan solo un 46% de especie dimérica.

Por tanto, nuestros resultados demuestran que la mutación C444S por sí sola no es capaz de alterar la dimerización de la TryR, pero acompañada de la mutación E436A sí parece tener un efecto en la misma.

- Ensayo de unión de FAD:



**Figura 35.** Cantidad de FAD unido por cada una de las TryR calculado mediante el ratio  $A_{450}/A_{280}$ .

Una vez más se observó que, si bien la mutación de la C444 a serina no disminuye la capacidad de la enzima de unir FAD, la doble mutante E436A/C444S es capaz de unir hasta un 45% menos de FAD que la WT y aproximadamente un 30% menos que E436A. Cabe destacar así mismo el caso de la E436K, que resulta la proteína con menor capacidad para unir FAD, hasta un 73% menos que la WT, lo que podría deberse a la gran inestabilidad de la proteína resultante que tiende a formar agregados mayores que el dímero nativo.

## 2.8. Inhibición de la dimerización de la TryR.

### 2.8.1. Diseño de un inhibidor de la dimerización de la TryR.

Hemos determinado que el E436 es un residuo clave para la dimerización y, por tanto, la actividad enzimática de la TryR. El siguiente paso consistió en diseñar una molécula capaz de inhibir la dimerización de la TryR silvestre.

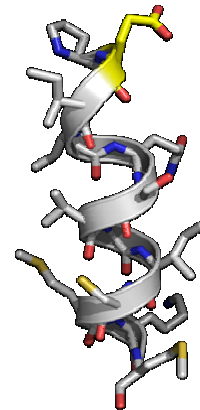
El E436 se encuentra dentro de una hélice  $\alpha$  contenida en el dominio de dimerización de la proteína, así que inicialmente se optó por la aproximación más sencilla, que era probar como inhibidor un péptido formado por la secuencia de aminoácidos de dicha hélice (péptido 1). Dado que entre las C444 se podrían formar puentes disulfuros intermoleculares que podrían afectar a la inhibición de la dimerización, se propuso sintetizar otro péptido en el que se cambia dicho residuo por serina (péptido 2). Estos dos péptidos llevan los extremos amino y carboxilo libres, lo que puede favorecer la degradación de los mismos por acción de proteasas. Debido a esto, se diseñó un tercer péptido igual que el 2, pero con los extremos protegidos: el extremo amino acetilado y el carboxilo en forma de amida (péptido 3). Por último, se diseñó un cuarto péptido que tuviera la secuencia mínima para mantener la helicidad del mismo (verificado con el programa AGADIR, <http://agadir.crg.es/>), también con los extremos protegidos de la misma manera que el péptido anterior (péptido 4). Todos estos péptidos se mandaron sintetizar a una casa comercial.

Péptido 1: H<sub>2</sub>N-PE<sub>436</sub>IIQSVGICMKM-COOH

Péptido 2: H<sub>2</sub>N-PE<sub>436</sub>IIQSVGISMKM-COOH

Péptido 3: Ac-PE<sub>436</sub>IIQSVGISMKM-Amd

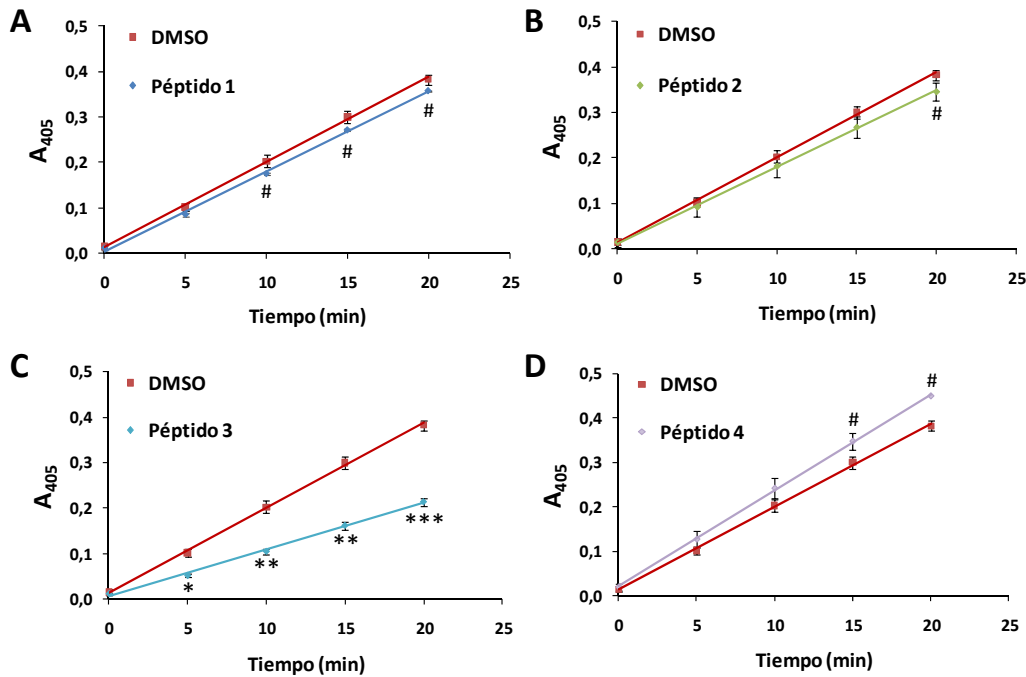
Péptido 4: Ac-PE<sub>436</sub>IIQSVGIS-Amd



**Figura 36.** Secuencia y estructura de los péptidos propuestos como inhibidores de la dimerización de la TryR. Péptido 1, con la misma secuencia que la TryR WT y péptido 2 con la secuencia WT, pero cambiando la C444 por serina. En ambos se indica en amarillo el E436.

### 2.8.2. Inhibición de la actividad de la TryR.

La actividad de la enzima silvestre en presencia de los posibles inhibidores se determinó de forma análoga a los ensayos de actividad anteriores: TryR WT 75 nM, HEPES 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y NADPH 0.15 mM, con la diferencia de que se preincubó la proteína con cada uno de los péptidos a 25  $\mu$ M o con DMSO (solvente de los péptidos), durante una hora con agitación. Se añadió el DTNB 25  $\mu$ M y se disparó la reacción añadiendo TS<sub>2</sub> 1  $\mu$ M. El curso de la reacción se siguió midiendo la absorbancia a 405 nm durante veinte minutos (fig. 37).

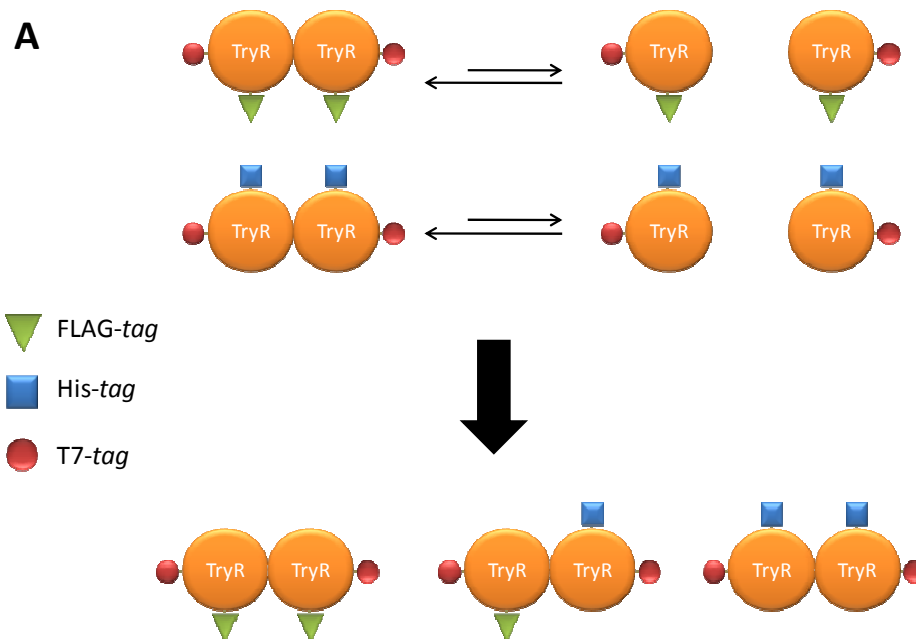


**Figura 37.** Ensayos de actividad de la TryR WT en presencia de DMSO y los péptidos 1 (A), 2 (B), 3(C) o 4(D) a una concentración de 25  $\mu$ M (#  $p < 0.05$ ; \*  $p < 0.01$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

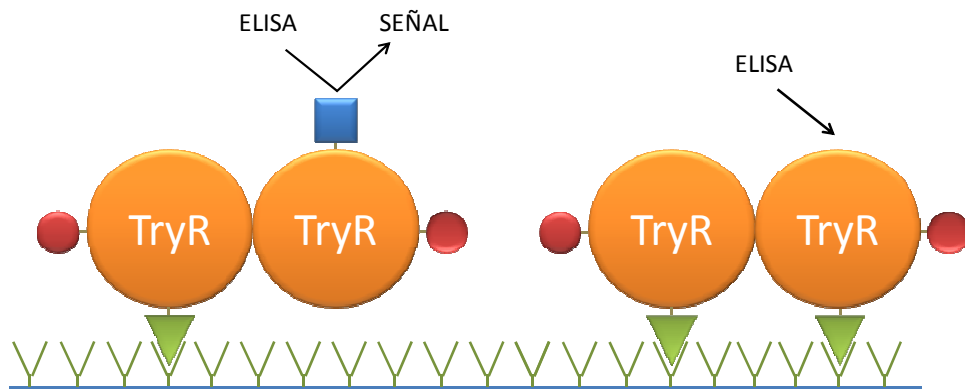
Se observó que tanto el péptido 1, como el 2 tienen un pequeño efecto inhibitorio de la actividad de la TryR; el péptido 4 no solo no inhibe, si no que parece activar ligeramente la TryR. Finalmente el péptido 3 sí que tiene un fuerte efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la TryR silvestre.

### 2.8.3. Inhibición de la dimerización de la TryR.

Hemos diseñado un péptido (péptido 3) capaz de inhibir la actividad de la TryR pero, una vez más, no sabemos si estamos inhibiendo la dimerización de la proteína. Necesitamos diseñar un ensayo de dimerización que nos permita determinar la influencia de nuestro péptido en este proceso. Para ello nos basamos en un método descrito por Sluis-Cremer et al.<sup>197</sup>. En pocas palabras, la técnica se basa en marcar una TryR WT con un FLAG-tag y ponerla en contacto con otra TryR WT que está marcada con His-tag. El proceso de dimerización es un equilibrio entre los dímeros y los respectivos monómeros. Si dejamos las dos TryR en contacto el tiempo suficiente y en las condiciones adecuadas, se formará un determinado porcentaje de heterodímero (el término heterodímero se refiere tan sólo a la presencia de tags distintos en cada monómero ya que, a excepción de los tags los dos monómeros son idénticos) que portará tanto el His-tag, como el FLAG-tag (fig. 38A). Después, en una placa tapizada con un anticuerpo anti-FLAG retendremos selectivamente sólo las proteínas que tengan dicho tag, tanto el homodímero FLAG-tag/FLAG-tag como el heterodímero FLAG-tag/His-tag. Por último realizaremos un ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) con un anticuerpo anti-His, de tal manera que detectaremos de forma selectiva el heterodímero (fig. 38B).



**Figura 38. A.** Ensayo de dimerización de la TryR. A: Equilibrios dímero-monómeros para cada una de las TryR WT. Se indican los 2 posibles homodímeros y el heterodímero resultantes.

**B**

**Figura 38. B.** Diagrama del ELISA diseñado para la detección del heterodímero.

Además, en este diseño las dos TryR tienen un *tag* extra, el T7, con lo que se puede realizar un ELISA con un anticuerpo frente a T7 que nos servirá como un pseudo-control de carga, para ver si las diferencias de señal en el ensayo se deben a inhibición de la dimerización o a menor cantidad de proteína unida a la placa.

#### Generación de una TryR-FLAG.

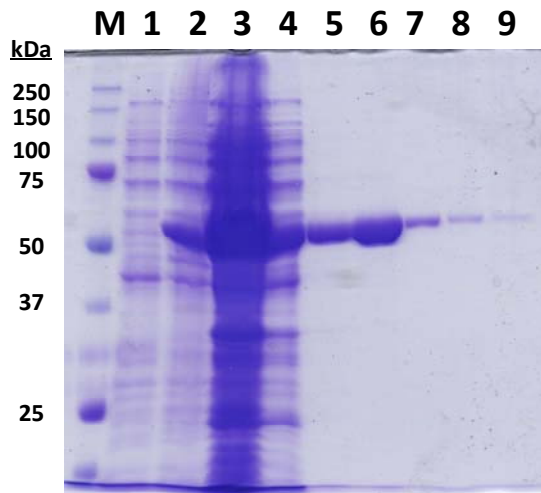
Lo primero que necesitábamos era una TryR marcada con el FLAG-*tag* pero sin el His-*tag* (en este punto recordar que la proteína silvestre utilizada en todos los ensayos descritos anteriormente en esta memoria fue purificada gracias a la presencia del His-*tag*). Para ello, tomando como molde el pRSET A-TryR y mediante técnicas de biología molecular, se digirió el ADN obteniéndose la secuencia de la TryR sin el His-*tag* y se le ligó la secuencia codificante para el FLAG-*tag*. Esta construcción se clonó en el vector de expresión pET24a, que posee el T7-*tag* generándose la construcción pET24a-FLAG-TryR (fig. 39).



**Figura 39.** Construcción pET24a-FLAG-TryR. Se indica en rojo el T7-*tag* perteneciente al vector.



Con este ADN se transformaron bacterias competentes DH5 $\alpha$ . Realizamos un cribado por PCR de las colonias para determinar cuáles habían incorporado la construcción, seleccionando una positiva, se purificó el ADN del plásmido y con el mismo transformamos la cepa de expresión Rosetta de *E. coli*. Se realizó un cultivo preparativo de las mismas, induciendo la expresión de una forma análoga a la utilizada para las anteriores mutantes y se realizó una purificación por cromatografía de afinidad en columna con una agarosa con el anticuerpo anti-T7 acoplado covalentemente (fig. 40).



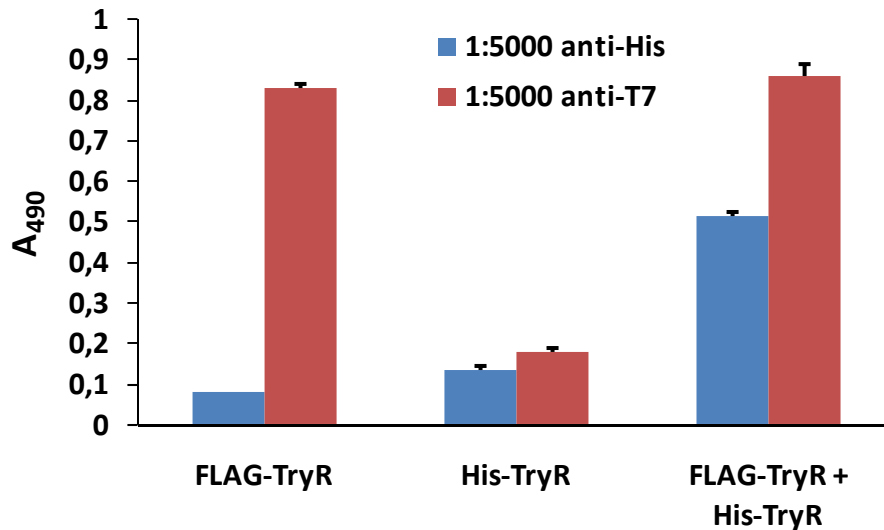
**Figura 40.** Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie, correspondiente a la electroforesis de las muestras de la purificación de la proteína FLAG-TryR. M: marcador de pesos moleculares; 1: preinducción; 2: postinducción; 3: *flow-through*; 4: lavado; 5-9: eluido.

Las fracciones con la proteína FLAG-TryR purificada (5-9) se concentraron con un Amicon de 30kDa de *cut-off* donde además cambiamos el tampón por el mismo en el que estaba la His-TryR, obteniendo alrededor de 1mg de proteína purificada.

#### **Ensayo de dimerización de la TryR.**

Una vez obtenidas las dos TryR marcadas con *His-tag* y *FLAG-tag* respectivamente, pasamos a montar el ensayo de dimerización que consiste en lo siguiente: cantidades equimolares de FLAG-TryR Y His-TryR son coincubadas con agitación y a 37°C durante 16 horas para favorecer la disociación de los dímeros. Después, pasamos las proteínas a una placa tapizada con un anticuerpo frente a FLAG donde se incuban con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Lavamos la proteína no unida específicamente y, para detectar el heterodímero FLAG-TryR/His-TryR, realizamos un ELISA frente a His. Para verificar que la cantidad de proteína dispuesta en cada pocillo

es la misma, se realiza en paralelo un ELISA frente a T7 (fig. 41). Como controles del experimento realizamos el mismo proceso incubando sólo FLAG-TryR ó sólo His-TryR (en ambos casos a doble concentración para igualar la concentración de TryR del ensayo en el que se mezclan ambas *tags*).



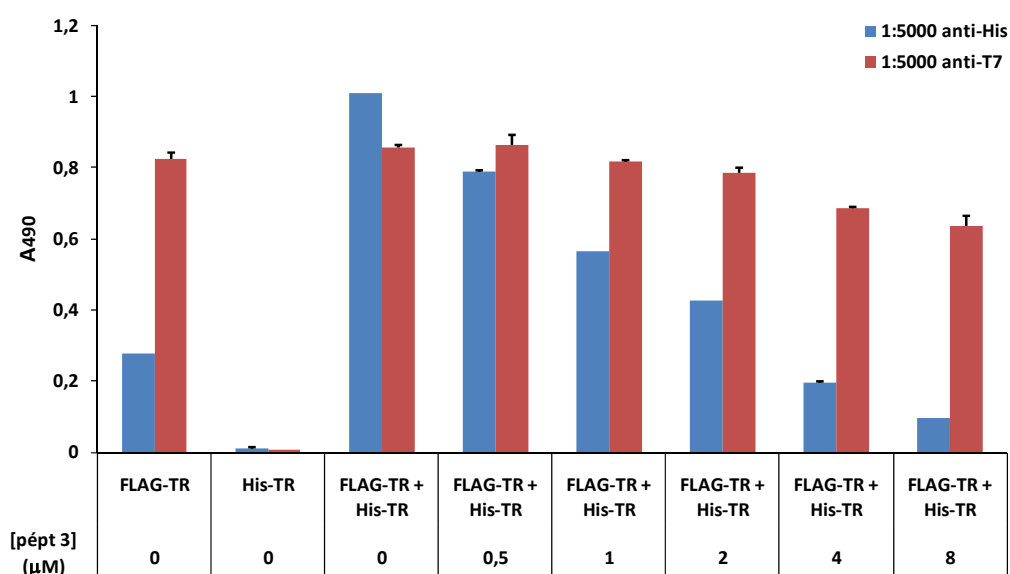
**Figura 41.** Ensayo de heterodimerización de TryR. Cuantificación mediante ELISA de la cantidad de heterodímero FLAG-TryR—His-TryR formado. En azul la señal correspondiente al ELISA con anti-His y en rojo la señal correspondiente al ELISA con anti-T7 (control de carga de proteína).

Al analizar la señal debida al anticuerpo anti-His (columnas azules) observamos que en los pocillos en los que hay una mezcla de las dos TryR se observa un incremento de la señal con respecto a las señales de las dos proteínas por separado lo que indica que, tal y como se esperaba, con la incubación durante 16 horas a 37°C se produce un intercambio de subunidades entre los dímeros que conduce a la aparición de dímeros mixtos FLAG-TryR/His-TryR que quedan retenidos en la placa tapizada con anti-FLAG y son luego detectados con anti-His. El revelado con anti-T7 (columnas rojas) verificó que este incremento de la señal no se debe a una mayor cantidad de proteína en el pocillo, tal y como se deduce de la señal equivalente observada en los pocillos que contienen solo FLAG-TryR y aquellos que contienen FLAG-TryR/His-TryR (recordemos que ambas construcciones están marcadas con T7). Las señales en el ELISA con anti-

His (columnas azules) que se observan en los pocillos donde sólo hay FLAG-TryR (no debería haber señal con anti-His) y His-TryR (no debería haber proteína pegada a la placa) se deben a cierta inespecificidad del anti-His utilizado en el ELISA y del anti-FLAG que tapiza la placa respectivamente.

### Inhibición de la dimerización de la TryR.

Con el ensayo de dimerización puesto a punto, se procedió a testar la capacidad del péptido 3 de inhibir la dimerización de la TryR. Para ello, se realizó un ensayo de dimerización análogo al anterior, solo que en este caso se incubó la mezcla de FLAG-TryR y His-TryR con concentraciones crecientes del péptido 3 (0,5, 1,0, 2,0, 4,0 y 8,0  $\mu\text{M}$ ) durante las 16h de agitación a 37°C. El resto del ensayo se realizó exactamente en las condiciones ya descritas (fig. 42).

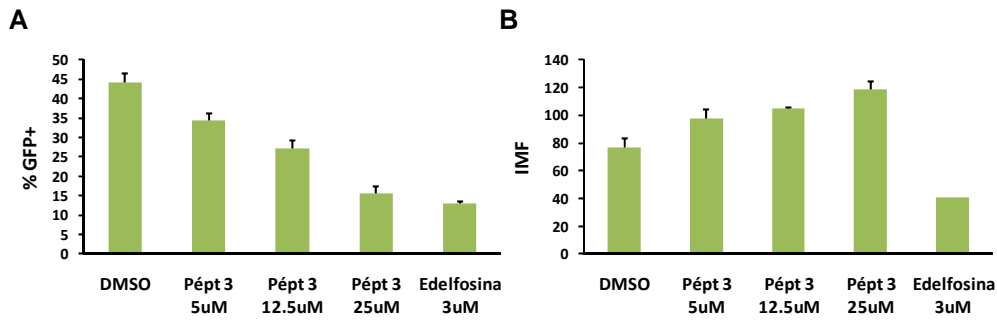


**Figura 42.** Ensayo de inhibición de la heterodimerización de TryR por el péptido 3. Cuantificación mediante ELISA de la cantidad de heterodímero FLAG-TryR—His-TryR formado en presencia de concentraciones crecientes de péptido 3. En azul la señal correspondiente al ELISA con anti-His (cantidad de heterodímero) y en rojo la señal correspondiente al ELISA con anti-T7 (control de carga de proteína).

Los resultados mostrados en la figura 42 demuestran que el péptido 3 no solo es capaz de inhibir la actividad de la TryR sino también su dimerización. Se observó que existe un claro efecto de dosis-respuesta entre la cantidad de péptido presente en el ensayo y el porcentaje de heterodímero formado. La  $IC_{50}$  del péptido 3 con referencia a la inhibición de la formación del dímero de TryR es de  $1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ . Además se observa que, aunque en mucha menor medida, la incubación con el péptido también disminuye la señal del ELISA con anti-T7, lo que indica una disminución en la cantidad de proteína en el pocillo. Parece lógico ya que el péptido no sólo inhibe la formación del heterodímero FLAG-TryR—His-TryR sino también la del homodímero FLAG-TryR—FLAG-TryR, evitándose de esta manera la formación de este tipo de dímero y reduciéndose por tanto la cantidad de proteína con T7 presente en la placa.

#### **2.8.4. Efecto leishmanicida del péptido 3 en infecciones de macrófagos con amastigotes.**

Nuestros resultados indican que hemos sido capaces de diseñar un péptido capaz de inhibir la dimerización y por tanto la actividad de la TryR de *L. infantum*. ¿Tiene este péptido un efecto leishmanicida? En primer lugar realizamos un ensayo de viabilidad incubando los amastigotes de *Leishmania* y los macrófagos THP-1 con concentraciones crecientes de dicho péptido. No se observa toxicidad alguna para ninguno de ellos (resultados no mostrados). Es posible que para que el péptido pueda ejercer un efecto tóxico, los amastigotes tengan que estar sometidos a un estrés oxidativo del que les sea más difícil escapar, al tener inhibida la funcionalidad de una de las proteínas involucradas en las rutas de detoxificación. Para elucidar esta cuestión, procedimos a realizar infecciones de macrófagos THP-1 con amastigotes de *L. infantum* que expresan la proteína eGFP. Se trataron los macrófagos con concentraciones crecientes del péptido 3 y, a las 48 horas, se estudió tanto el porcentaje de células infectadas, como la intensidad de fluorescencia media de las mismas (fig. 43).

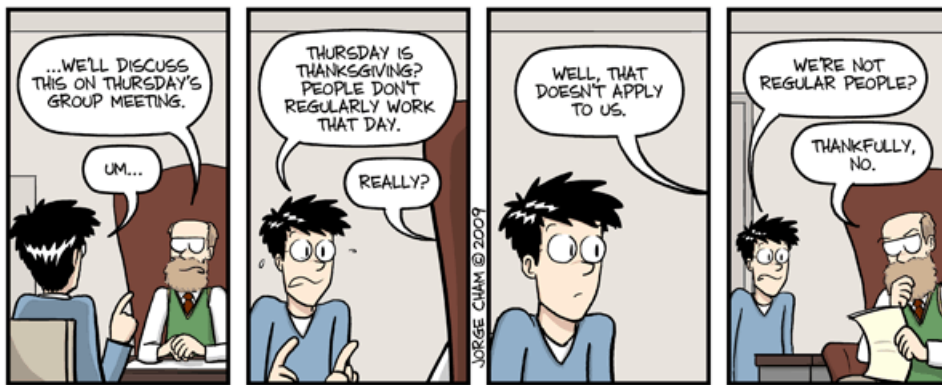


**Figura 43.** Actividad del péptido 3 en macrófagos THP-1 infectados con amastigotes. A: Porcentaje de macrófagos THP-1 que emiten fluorescencia verde tras 48 horas de tratamiento con DMSO, péptido 3 a 5.0, 12.5 y 25.0  $\mu$ M y edelfosina 3  $\mu$ M respectivamente. La fluorescencia verde es debida a la presencia de amastigotes de *L. infantum* que expresan la eGFP dentro de los macrófagos. B: Intensidad media de fluorescencia (IMF) verde de los macrófagos THP-1 que contienen amastigotes que expresan eGFP tras 48 horas de tratamiento con DMSO, péptido 3 a 12.5 y 25.0  $\mu$ M y edelfosina 3  $\mu$ M.

Atendiendo al porcentaje de infección observamos que, mientras que el 44% de las células control tratadas exclusivamente con DMSO están infectadas, este valor disminuye hasta el 15% en las células tratadas con una concentración 25  $\mu$ M de péptido 3, lo que supone una reducción del 65% en las tasas de infección. Es destacable que a esta concentración no se observa citotoxicidad alguna en los macrófagos. De la figura 28 se deduce también un claro aumento del efecto protector del péptido 3 en función de su concentración.

El análisis de la intensidad media de fluorescencia de las células infectadas se incrementa sorprendentemente según aumenta la concentración del péptido 3. Este resultado podría ser interpretado inicialmente como un aumento en el número de amastigotes presentes en los macrófagos que se mantienen infectados tras el tratamiento. Sin embargo un análisis detallado de los resultados indica que el aumento de la señal fluorescente debe considerarse debido a la emisión de fluorescencia por el propio péptido, tal y como se deduce del hecho de que el citado aumento de fluorescencia se observe también en macrófagos sin infectar incubados con el péptido (datos no mostrados).

Nos vemos en condiciones de afirmar que el péptido 3 tiene un efecto leishmanicida dosis-dependiente en macrófagos THP-1 infectados con amastigotes de *L. infantum*.





## DISCUSIÓN

*Jamás hemos tenido un arsenal tecnológico tan sofisticado para tratar las enfermedades y aún así, el vacío de su repercusión en la salud se va haciendo más y más grande, Esto es inaceptable.* Este ruego, reivindicando llenar el vacío existente países ricos y pobres, fue pronunciado por Margaret Chan en su primer discurso oficial como Directora General de la OMS en agosto del 2007. El drama reside en que es una reivindicación se une las que vienen sosteniendo sus antecesores en el cargo durante los últimos treinta años. Según datos de la OMS <sup>198</sup>, las enfermedades tropicales olvidadas (NTD por el inglés *Neglected Tropical Diseases*) afectan a 1.000 millones de personas, un sexto de la población mundial, produciendo 550.000 muertes al año <sup>199</sup>, por lo que representan uno de los mayores retos a los que se enfrenta la ciencia y la salud pública. A pesar de ello, el grifo de producción de nuevos fármacos para el tratamiento de las NTD está prácticamente cerrado. No es un problema de falta de recursos en la investigación básica, que es de alta calidad, sino del proceso de trasladar los resultados de esta investigación al campo del tratamiento, un proceso largo y costoso, que desalienta a las farmacéuticas a invertir en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de estas enfermedades. Además, conviene recordar que nuestra “cultura académica”, enfocada a recompensar publicaciones y a la creación de riqueza, no ha hecho sino agravar el problema y ensanchar ese vacío.

Dentro de las NTD, aquellas enfermedades producidas por agentes englobados en la familia Trypanosomatidae y que se concentran principalmente en las regiones rurales más pobres del planeta, son unas de las que poseen índices de mortalidad más altos. Concretamente, *Trypanosoma* es responsable de la enfermedad de Chagas en Sudamérica y la enfermedad del sueño en África, mientras que *Leishmania* es responsable de los distintos tipos de leishmaniasis que son endémicas en 88 países distribuidos en África, sur de Asia y Latinoamérica. A pesar de sus terribles índices de mortalidad, son poco o nada conocidas en el mundo occidental. Los fármacos disponibles para el tratamiento de estas enfermedades son escasos, tóxicos y en su mayoría con décadas de antigüedad, lo que unido a la mala praxis ha originado la aparición de parásitos resistentes a los distintos fármacos. En estos momentos, la terapia combinada de los mismos es la única solución factible para combatir estas enfermedades, ya que se consigue mejorar la eficacia de los fármacos, disminuir su toxicidad, evitar la generación de resistencias y disminuir el tiempo y coste del tratamiento.



En el caso concreto de la leishmaniasis y de cara al futuro más inmediato, las perspectivas según la OMS no son nada halagüeñas ya que, al no existir en estos momentos ningún nuevo candidato susceptible de entrar en ensayos clínicos, no se prevé el desarrollo de ningún fármaco anti-*Leishmania* nuevo en la próxima década.

La necesidad de desarrollar nuevos tratamientos seguros, eficaces y económicos contra las distintas formas de leishmaniasis constituye el leitmotiv del trabajo presentado en esta tesis.

## **1. Cribado de alto rendimiento de compuestos con posibilidades de ejercer un efecto anti-*Leishmania*.**

Hemos puesto a punto un método de cribado de alto rendimiento de compuestos que nos ha permitido, gracias a las colaboraciones con distintos grupos especializados en síntesis, evaluar la actividad leishmanicida de más de 160 compuestos en las dos etapas de su ciclo vital, esto es promastigotes y amastigotes, y probar su citotoxicidad en dos líneas celulares humanas. Aún estando lejos de la capacidad de cribado de la que disponen las grandes empresas farmacéuticas<sup>200</sup>, no deja de ser reseñable que se haya puesto a punto un sistema como éste en un pequeño laboratorio que se encuentra dentro del entorno universitario ya que, con las colaboraciones actuales y venideras, se sientan las bases implementar un método diseñado para la búsqueda de nuevos fármacos anti-*Leishmania*. Sin duda, la puesta a punto de un rápido método de análisis de las poblaciones de parásitos que utiliza las características de adquisición del citómetro de flujo FC-500 ha sido esencial para permitir un cribado de moderada capacidad.

### **1.1. Compuestos con Se.**

Se probaron un total de 38 compuestos con Se, divididos en selenocianatos y diseleniuros (27 en total) y alquil-imidoselenocarbamatos (11) además de algunos alquil-imidotiocarbamatos (4).

#### *Selenocianatos y diseleniuros.*

Tras realizar las primeras fases del cribado y como puede verse en los resultados mostrados en las tablas 1 y 2, se seleccionaron un total de 9 compuestos con actividad leishmanicida mayor que la de la miltefosina (**1b**, **1g**, **1e**, **1j**, **1k**, **2a**, **2b**, **2e** y **2k**) siendo

6 de ellos también más potentes que la edelfosina (**1e**, **1j**, **2a**, **2b**, **2e** y **2k**), dos fármacos referencia por su actividad anti-*Leishmania*<sup>53, 201</sup>.

En lo que se refiere a la toxicidad comparada entre parásitos y células humanas, los índices de selectividad de los diseleniuros son siempre mayores que los de los correspondientes selenocianatos y, los de todos ellos, mayores que los de los fármacos referencia. En este punto el compuesto más interesante es el **2e** que resulta 7.5 y 12.7 veces más selectivo que la edelfosina para células Jurkat y THP-1 y 4 y 11 veces más selectivo que la miltefosina para las mismas líneas celulares.

Cuando pasamos a evaluar la actividad de los mejores selenocianatos y diseleniuros en macrófagos infectados con amastigotes, descubrimos que los primeros no tienen ningún efecto protector para los macrófagos pues resultan incapaces de revertir la infección, cosa que si consiguen en mayor o menor medida los diseleniuros. Ahora bien, de los 4 diseleniuros más prometedores, el **2e** resultó ser un compuesto con muy baja actividad frente a amastigotes intracelulares. Sin embargo, tanto el compuesto **2a**, como el **2b** disminuyen un 75% y 60% el porcentaje de macrófagos infectados, llegando a niveles cercanos a los de la edelfosina (90% de reducción). Además, al analizar la carga parasitaria de los macrófagos que se mantienen infectados tras el tratamiento, observamos que **2a** la reduce en un 30%, idéntico valor que el obtenido para edelfosina, y **2b** lo hace en un 18% (fig. 12). Es muy posible que la pérdida parcial de efectividad que se observa en los compuestos en los ensayos sobre macrófagos infectados respecto de la obtenida en cultivos de amastigotes *in vitro* sea debida a la existencia de barreras físicas y metabólicas que tienen que ser superadas por cualquier molécula a la hora de ejercer su efecto leishmanicida dentro de un macrófago humano.

Los resultados obtenidos a lo largo de todo el proceso de cribado ponen de manifiesto que, dada la complejidad de los procesos que deben tener lugar hasta que un posible fármaco alcanza su diana, es relativamente frecuente que compuestos que tienen un excelente comportamiento en las primeras fases de cribado no lleguen a consolidarse como buenos candidatos para el tratamiento de la enfermedad según los ensayos se acercan progresivamente a la situación natural: un individuo completo infectado por el parásito. En este sentido, 9 compuestos mostraron índices de selectividad mejores que los de miltefosina en los ensayos *in vitro*. Sin embargo, ninguno de ellos fue capaz de superar la actividad leishmanicida de edelfosina en ensayos con macrófagos infectados. Previsiblemente el proceso de eliminación progresiva de moléculas candidatas se intensificará cuando el análisis se realice sobre animales.

Tomados todos los resultados en su conjunto, se deduce que los mejores compuestos son el **2a**, con un sustituyente amino, y el **2b**, con un sustituyente *N, N*-dimetilamino en la posición 4 del anillo aromático respectivamente. Esta serie de compuestos no solo muestra prometedoras propiedades como profármacos, sino que además su síntesis es sencilla y económica lo que apoya futuros estudios *in vivo* y el desarrollo de su posible utilización en países en vías de desarrollo, donde el coste de las terapias es uno de los principales factores limitantes.

#### *Alquil-imidoselenocarbamatos.*

Los resultados mostrados en las tablas 3 y 4 no nos permiten establecer una relación estructura-actividad precisa en los alquil-imidoselenocarbamatos, pero sí que es posible señalar algunas tendencias generales:

1) La sustitución del S en **1**, **3**, **5** y **12** por Se para obtener las estructuras **2**, **4**, **6** y **13** tiene un efecto positivo en la actividad: mientras que los compuestos con S pueden considerarse inactivos, sus análogos con Se presentan una actividad notable. Esta observación concuerda con estudios previos relativos a su actividad antitumoral<sup>187-190</sup>.

2) Los anillos heteroaromáticos confieren una mayor actividad leishmanicida que los anillos aromáticos simples. Concretamente, el compuesto **4**, un derivado de piridina no sustituido es muy activo frente a la forma promastigote (más del 50% de inhibición del crecimiento en todas las concentraciones utilizadas), mientras que su análogo aromático **6** no es efectivo en las mismas condiciones. La misma conclusión se obtiene al comparar el compuesto **2** (anillo de piridina con un cloro) y el **10** (anillo fenilo).

3) No se puede establecer ninguna correlación en relación a la presencia en el anillo aromático de sustituyentes con grupos electronegativos (trifluorometil, cloro) o grupos dadores de electrones (metil, metoxi). Por ejemplo, los compuestos **13** (con un metil) y **14** (con un trifluorometil) son activos, mientras que los compuestos **10** (con un cloro) y **9** (con un trimetoxi) son inactivos.

Los compuestos con mejor actividad frente a los amastigotes de *Leishmania* son el **2** ( $IC_{50} = 4.7 \mu M$ ) y el **4** ( $IC_{50} = 3.0 \mu M$ ), que a su vez son los que muestran mejores índices de selectividad al realizar ensayos de citotoxicidad con células humanas. Sus valores son similares a los de la edelfosina y miltefosina para las THP-1 y algo más pequeños que para las Jurkat.

En lo que se refiere a la actividad leishmanicida en macrófagos infectados de los alquil-imidoselenocarbamatos más potentes, observamos que tanto el compuesto **2** como el **4** tienen un efecto protector claro, moderado en el caso de **2** (13% de reducción a las 96h) y tan solo ligeramente inferior al de edelfosina (reducción del 87%) en **4** (reducción del 62%). Además, atendiendo al número de parásitos que quedan dentro de los macrófagos, para los compuestos **2** y **4** se observa una reducción del 26% y 35% respectivamente, siendo esta última una reducción similar a la alcanzada con edelfosina (fig. 13).

Resumiendo, el presente trabajo confirma la actividad leishmanicida de los imidoselenocarbamatos, entre los que los compuestos **2** y **4**, ambos con un anillo de piridina, sobresalen como los dos derivados más prometedores. Dada la sencillez de la síntesis de estos compuestos, es posible preparar una gran variedad de análogos para optimizar sus actividades *in vitro* e *in vivo*. Todos los compuestos presentados aquí se sintetizan de una forma simple y sencilla, lo que puede ser importante a la hora de escalar el proceso con vistas al tratamiento de enfermedades que afectan a países en vías de desarrollo.

## 1.2. Compuestos catiónicos derivados de los sistemas de azaquinilizinio y quinolizinio.

El cribado realizado sobre una batería de sales de azaquinilizinio y quinolizinio nos ha permitido evaluar un total de 41 compuestos y determinar que 10 de los mismos no solo tienen un potente efecto leishmanicida *in vitro*, sino que además, atendiendo a nuestros estudios de citotoxicidad, presentan mejores índices de selectividad que los fármacos referencia empleados: edelfosina y miltefosina.

Posteriormente, al evaluar su actividad en macrófagos infectados con amastigotes de *L. infantum*, el número de compuestos con una actividad leishmanicida satisfactoria se redujo a 3: las sales de azaquinilizinio **EBM-70a**, **EBM-F002** y **EBM-F003**. Los dos primeros son capaces de rebajar el porcentaje de células infectadas al mismo nivel que la edelfosina: 74% de reducción en el caso de **EBM-70a**, 76% de reducción para **EBM-F002**, 80% de reducción para edelfosina. **EBM-F003** resulta incluso más efectivo, reduciendo el porcentaje de macrófagos con amastigotes intracelulares en un 90%. Además, el número medio de parásitos dentro de las células que se mantienen infectadas se reduce significativamente tras el tratamiento con el compuesto **EBM-70a** (50% de reducción), **EBM-F003** (34% de reducción) y **EBM-F002** (25% de reducción), siendo los dos primeros tanto o más efectivos que la edelfosina (34% de reducción).

Estas sales de azaquinilizinio son estructuralmente parecidas a algunos derivados de quinoxalina que ya han demostrado tener propiedades anti-*Leishmania* en estudios previos en promastigotes en cultivo<sup>202</sup>. En nuestro caso hemos conseguido ir un par de pasos más allá puesto que, no sólo hemos detectado 10 compuestos con un potente efecto leishmanicida frente a amastigotes en cultivo, sino que además 3 de ellos mantienen dicha actividad en macrófagos humanos infectados con esos amastigotes sin que se observe toxicidad alguna en los macrófagos humanos ensayados. Estos resultados abren la vía para futuros ensayos *in vivo* y, además, los compuestos **EBM-70a**, **EBM-F002** y **EBM-F003** se pueden tomar como cabeza de serie para el desarrollo de nuevas moléculas más activas y con mejores índices de selectividad.

## 2. Inhibición de la dimerización de la TryR de *L. infantum*.

La inhibición del proceso de dimerización de proteínas como terapia farmacológica en el tratamiento de enfermedades parasitarias es una estrategia pionera que se está utilizando con éxito hoy en día en el campo otras enfermedades como son el SIDA, inhibiendo la dimerización de la transcriptasa inversa del HIV-1<sup>164-167, 203, 204</sup> o el cáncer de mama, inhibiendo la dimerización del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano<sup>205, 206</sup>.

Gracias a la red de colaboradores establecida entre nuestro grupo de investigación, el Laboratorio de Modelado del Dr. Federico Gago en el departamento de Farmacología de la Universidad de Alcalá y el grupo de la Dra. M<sup>a</sup> José Camarasa en el Instituto de Química Médica, tenemos la posibilidad de afrontar el reto de la inhibición de la dimerización de la TryR mediante una estrategia multidisciplinar con expertos en los campos de la bioinformática, bioquímica, biología molecular y química sintética.

### 2.1. Hot-spots de la dimerización.

En primer lugar y dado que al comienzo de esta tesis no se había caracterizado la estructura de la TryR de *L. infantum*, el trabajo sobre la TryR comenzó con la elaboración de un modelo sobre la estructura de la proteína en base a su homología con otras proteínas descritas, tomando finalmente como molde la estructura de la TryR de *C. fasciculata*. Durante el periodo de desarrollo de la fase experimental de la presente tesis, la estructura de la enzima de *L. infantum*, obtenida en base a experimentos de difracción de rayos X, ha sido publicada<sup>47</sup>. La comparación de nuestro modelo con la estructura cristalográfica genera una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.6 Å, lo que demuestra la exactitud de nuestro modelo inicial.

Mediante el empleo de herramientas informáticas, procedimos a la búsqueda de los posibles *hot-spots* de dimerización. Gracias al programa NACCESS determinamos cuáles son los residuos que, para cada monómero, se hallan menos expuestos al disolvente en la TryR dimerica. Es decir, cuáles son los residuos que se hallan más enterrados en el otro monómero de la proteína. Los residuos que destacan en este aspecto en mayor medida son Y69, W81, E436, Q439 e I458.

Las interacciones electrostáticas y de van der Waals son especialmente relevantes en la estabilización de dímeros de proteínas. La contribución de cada residuo a estas interacciones en la interfaz de dimerización de TryR se evaluó mediante el uso del programa AMBER, según el cual los residuos con mayor contribución a las

interacciones electrostáticas son E82, N91, E436, y Q439, mientras que aquellos que contribuyen en mayor medida a las interacciones de van der Waals son F79 y W81.

Al contrastar los resultados obtenidos mediante las tres aproximaciones computacionales pudimos observar que tres residuos destacan en al menos dos de los tres parámetros estudiados como parte importante de la energía de dimerización: W81, E436 y Q439.

Concretamente, el W81 es el que presenta una mayor diferencia entre la superficie expuesta en el dímero y en los monómeros por separado. Estructuralmente se observa que este residuo queda “enterrado” dentro de un nicho apolar formado por Y69, M70, I73, L88, P90, G209 y Y210 del otro monómero. Por su parte, el carboxilo del E436 de un monómero interacciona mediante puentes de hidrógeno con los NH de S464 y A465 del esqueleto peptídico del otro monómero. De la misma manera, el CO de la Q439 de un monómero interacciona con el NH de la V460 del otro. Una vez publicada la estructura de la proteína, se ha podido comprobar que los tres residuos (W81, E436 y Q439) están implicados en la estabilización del dímero mediante puentes de hidrógeno <sup>47</sup>.

Para verificar nuestra hipótesis acerca de la importancia de estos tres residuos en la dimerización de la TryR, planteamos la generación de tres mutantes en las que cambiábamos cada uno de éstos por una alanina, resultando las proteínas W81A, E436A y Q439A. Como una primera aproximación, estudiamos la actividad enzimática de las mismas, comparándolas con la de la TryR WT. Observamos que, mientras que la Q439A presenta unas características enzimáticas similares a las de la proteína silvestre, tanto la W81A como la E436A son menos activas, resultando esta última mutante una enzima prácticamente inactiva.

Ahora bien, la disminución en la actividad puede ser debida a que, efectivamente, hayamos causado una pérdida de la capacidad del enzima para dimerizar o, simplemente, a que las mutaciones generan un plegamiento incorrecto de las proteínas. Esto último fue rápidamente descartado al verificar mediante experimentos de dicroísmo circular que tanto la proteína silvestre como las cuatro mutantes, no sólo estaban correctamente plegadas, sino que además tenían un plegamiento prácticamente idéntico.

Para estudiar el estado de oligomerización de una proteína existen multitud de técnicas experimentales: electroforesis de proteínas en condiciones nativas, ultracentrifugación analítica, cromatografía de exclusión molecular, dispersión

dinámica de la luz, microscopía electrónica, espectrometría de masas, *crosslinking* químico, etc. En nuestro caso nos decantamos por estudiar nuestras proteínas mediante las dos primeras. Además, dada la limpieza y sencillez del ensayo, nos planteamos complementar el estudio cuantificando mediante espectroscopía la cantidad de FAD que eran capaces de unir las distintas TryRs.

Nuestros resultados indican sin ninguna duda que la TryR WT purificada por nosotros se encuentra, prácticamente en su totalidad, en forma de dímero, lo que concuerda con los datos obtenidos por otros investigadores mediante cromatografía de exclusión molecular<sup>47</sup>. Los mismos resultados se obtienen para las mutantes W81A y Q439A de lo que se deduce que tanto el W81 como el Q439 no son claves en la dimerización de la TryR. Por el contrario, tanto los experimentos de electroforesis de proteínas en condiciones nativas como de ultracentrifugación analítica, confirman la existencia de dos especies en distinto grado de agregación en la mutante E436A, un 75% de la proteína como TryR dimérica y un 22% en forma de monómero. Además, esta última mutante es capaz de unir un 30% menos de FAD que las TryR WT, W81A y Q439A. Tomando todos estos resultados en conjunto, podemos afirmar que el E436 es un residuo clave que puede ser considerado un *hot-spot* en la dimerización de la enzima.

Esta idea fue reafirmada al estudiar una nueva mutante, la E436K, en la que en lugar de sustituir el E436 (residuo ácido) por una alanina (sin carga), se cambió por una lisina (residuo básico). La mutante resultante presenta problemas de solubilidad, es aún menos activa que la E436A y, estando correctamente plegada, presenta una dispersión entre distintos estados de agregación entre los que se observan especie monomérica, dímero y agregados proteicos mayores. Además es capaz de unir un 73% menos de FAD que la enzima silvestre. De todo esto se deduce que esta mutación desestabiliza en gran medida a la TryR.

Al finalizar el estudio de los *hot-spots* de dimerización propuestos inicialmente mediante cálculos informáticos, nos vemos en condiciones de certificar que uno de los tres (E436) efectivamente es un residuo clave para la dimerización de la TryR y otro de ellos (W81), aunque no se muestra imprescindible para el mantenimiento de la estructura dimérica, sí parece relevante para el ajuste fino de ambas superficies de dimerización, contribuyendo de manera efectiva a generar la estructura necesaria para la correcta actividad del enzima. Debido a esto, planteamos que la inhibición de la dimerización centrada en este punto concreto, puede ser una interesante diana farmacológica anti-*Leishmania*.



## 2.2. Inhibición de la dimerización de la TryR como estrategia farmacológica.

Dado que como hemos demostrado, el E436 es un residuo clave en la dimerización de la TryR y ésta es una proteína fundamental para el control del estrés oxidativo del parásito, nos planteamos diseñar moléculas capaces de interactuar selectivamente con la zona que ocupa dicho residuo e inhibir, de esta manera, la dimerización buscando generar una enzima monomérica y, por la tanto, inactiva.

Dado que el E436 se encuentra dentro de una hélice  $\alpha$ , diseñamos una serie de cuatro péptidos análogos a esta, con distintas modificaciones en los extremos y distinta longitud, buscando obtener aquel péptido que resulte más estable como hélice  $\alpha$  y además sea lo más resistente posible a la degradación ejercida por proteasas.

Ya que habíamos puesto a punto un sencillo ensayo de actividad TryR *in vitro*, inicialmente evaluamos la capacidad de cada uno de ellos para inhibir dicha actividad. Nuestros resultados prueban que de los 4 péptidos propuestos, el número 3 (Ac-PEIIQSVGISMKM-Amd) es capaz de inhibir la actividad enzimática de la TryR.

Una vez más, esta caída en la actividad enzimática no tiene porqué ser debida a una inhibición de la dimerización de la proteína, por lo que diseñamos un ensayo en el que se pudiera cuantificar de forma relativa la cantidad de dímero de TryR formado y, una vez puesto a punto, ver si esa cantidad de dímero cae por la coincubación de la TryR con el péptido 3. Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, dicho péptido es capaz de inhibir la dimerización de la enzima, observando de forma clara una relación dosis-respuesta.

En este punto, estamos en posesión de un péptido capaz de inhibir la dimerización y por tanto la actividad *in vitro* de una enzima clave en la supervivencia del parásito, pero no sabemos cómo se comportará nuestro inhibidor en un modelo biológico como el parásito. Para averiguar si el péptido posee actividad leishmanicida, probamos su efectividad en ensayos de toxicidad, comprobando que es completamente inocuo tanto para amastigotes de *Leishmania* como para macrófagos humanos THP-1. Es posible que el péptido sea incapaz de atravesar la membrana del parásito, que sea degradado rápidamente, que la cantidad de TryR que inhiba sea muy pequeña, o que los parásitos no necesiten mucha TryR activa en las condiciones del ensayo.

Dado que no esperamos que en estas condiciones los parásitos se encuentren sometidos a condiciones de especial estrés oxidativo, nos propusimos probar la

efectividad del péptido 3 en unos amastigotes que estuvieran sometidos a unas condiciones más agresivas. Para ello, estudiamos su efecto en células THP-1 infectadas con amastigotes que expresan la eGFP. En este caso sí que fuimos capaces de observar un claro efecto del péptido sobre los amastigotes intracelulares, ya que el porcentaje de macrófagos infectados decae claramente tras el tratamiento con el mismo. Un fenómeno curioso es que la fluorescencia de los macrófagos infectados aumenta al tratarlos con el péptido 3, fenómeno que no está relacionado con un aumento del número de amastigotes intracelulares pues el aumento de fluorescencia se observa en igual o incluso mayor medida en macrófagos no infectados. Estos resultados sugieren que el péptido presenta cierta fluorescencia, lo que podría ser de utilidad para determinar su localización intracelular mediante microscopía.

Tenemos en nuestro poder un péptido que, siendo capaz de inhibir la dimerización de la TryR *in vitro*, además ejerce un efecto leishmanicida en macrófagos humanos infectados con amastigotes de *L. infantum*. Es decir, nuestro péptido es capaz de atravesar las membranas de macrófagos y amastigotes e inhibir la TryR dentro del parásito, con el resultado de disminuir la capacidad del mismo de defenderse de un ataque oxidante.

Estos resultados abren toda una serie de vías de investigación de cara a 1) probar la efectividad del péptido 3 en un modelo animal, como pueden ser ratones infectados con amastigotes de *L. infantum*, 2) probar la efectividad del péptido 3 frente a otros parásitos tripanosomátidos como por ejemplo el *Trypanosoma*, responsable de la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño y 3) intentar mejorar desde un punto de vista sintético el péptido inhibitorio.

### 2.3. La cisteína 444, ¿sensor biológico de estrés oxidativo en tripanosomátidos?

El análisis detallado de la estructura de la TryR en su interfaz de dimerización nos reveló la existencia de dos cisteínas, una correspondiente a cada monómero, en posición 444 (C444) que se encuentran enfrentadas a una distancia de 3.33 Å. A pesar de ser una distancia ligeramente mayor de la esperada para la formación de un puente disulfuro, no se puede descartar la posible existencia de esta interacción covalente entre las dos monómeros que sería capaz de estabilizar la forma dimérica de la proteína. De ser así, contradeciría las evidencias experimentales publicadas hasta la fecha que afirman que, tanto en el cristal de la TryR de *C. fasciculata*<sup>207</sup>, como en el de *T. cruzi*<sup>208</sup> la densidad electrónica observada corresponde a tioles libres.

Para intentar determinar de una forma indirecta la presencia de ese puente disulfuro, nos planteamos generar dos mutantes: una en la que sustituimos la C444 por una serina (C444S) y otra en la que realizamos la misma sustitución pero sobre la mutante en la que previamente habíamos cambiado el E436 por una alanina, obteniendo una doble mutante (E436A/C444S).

Al igual que hicimos para las anteriores mutantes, en primer lugar evaluamos la actividad enzimática de las nuevas proteínas, observando que el cambio de la C444 por una serina no afecta en absoluto a la actividad enzimática ya que la mutante C444S posee unos parámetros enzimáticos similares a los de la TryR WT. Lo que resulta llamativo es que, si bien por si sola esta mutación no afecta a la actividad, al comparar la E436A con la doble mutante E436A/C444S se observa que esta última es una TryR con la misma eficiencia catalítica, pero con un número de recambio aún más bajo, de menos de la mitad del observado para la E436A, es decir, la E436A/C444S es capaz de reducir menos de la mitad del tripanotión que reduce la E436A en el mismo tiempo.

Una vez más, para descartar que la caída en la actividad de la doble mutante se debiera a un defecto en el plegamiento, estudiamos mediante dicroísmo circular la estructura secundaria de las nuevas mutantes, verificando que ambas estaban correctamente plegadas y con una estructura secundaria prácticamente idéntica a la de la TryR WT.

Con la idea de determinar el estado de oligomerización de las mutantes C444S y E436A/C444S, volvimos a recurrir a experimentos de electroforesis en condiciones nativas, ultracentrifugación analítica y de unión de FAD por cantidad de TryR. Los resultados obtenidos no dejan lugar a dudas: la sustitución de la C444 por serina no causa ningún defecto detectable por nuestros ensayos en la dimerización pero, asociada a una segunda mutación (E436A), incrementa significativamente los defectos en la dimerización ya observados en E436A, duplicándose la cantidad de monómero existente hasta alcanzar un 42% del total de la proteína.

Estos resultados refuerzan nuestra teoría de la posibilidad de que se forme un puente disulfuro intermolecular entre las C444 de cada monómero. Curiosamente, esta C444 está perfectamente conservada en todos los tripanosomátidos, pero no en la GR, análogo humano de la TryR (fig. 43).

<i>T. brucei</i>	APEIIQAVGVCLRLNAK	450
<i>T. congolense</i>	SPEIIQAVGICMKNNAK	450
<i>T. cruzi</i>	APEIIQGVGICLKLNAK	450
<i>L. donovani</i>	APEIIQSVGICMKHGAK	450
<i>L. infantum</i>	APEIIQSVGICMKHGAK	450
<i>C. fasciculata</i>	SPEIIQSVVAICLKHGAK	450
<b>Human GR</b>	CDEMLQGFVAVKHGAT	498
	. *::*.....*.	

Figura 43: Alineamiento de secuencia de TryR de distintos tripanosomátidos y GR humana.

Es posible que el estado de los tioles de las C444 dependa del entorno oxidante o reductor en el que se encuentre la proteína. Dado que los tripanosomátidos durante su ciclo vital sufren del estrés oxidativo producido por el sistema inmune del hospedador, la C444 podría actuar como un “sensor biológico” tal que, si el entorno en el que se encuentra el parásito es reductor, sus tioles estén libres, permitiendo la existencia de un equilibrio entre las formas monomérica y dimérica de la proteína. Según este modelo, un aumento del estrés oxidativo conduciría a la formación del puente disulfuro que sacaría a las formas diméricas del equilibrio y conduciría a un aumento de la capacidad reductora del sistema TryR/tripanotión, alcanzándose una mayor eficiencia en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

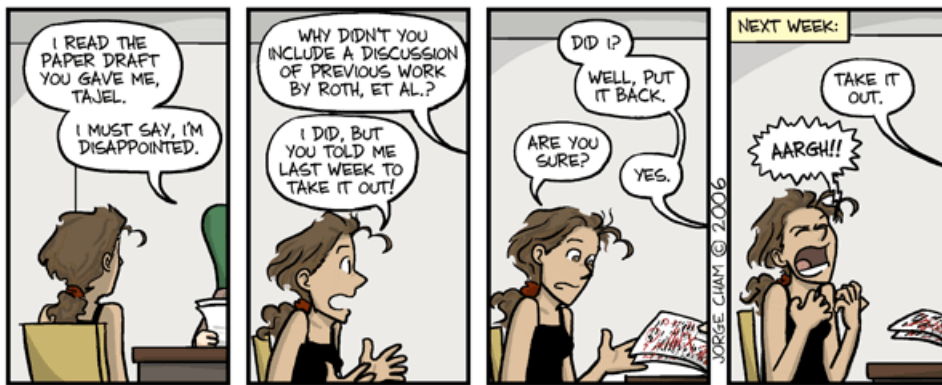
En futuros trabajos nos plantemos profundizar en la confirmación de la existencia o no existencia del hipotético puente disulfuro entre las C444.



## CONCLUSIONES

1. Hemos puesto a punto un método de cribado de alto rendimiento de compuestos para determinar su actividad frente a promastigotes y amastigotes de *L. infantum* en cultivos axénicos así como su toxicidad en células humanas.
2. Hemos puesto a punto un método de cribado de alto rendimiento de compuestos para determinar su actividad en cultivos de macrófagos humanos infectados con amastigotes de *L. infantum*.
3. Hemos llevado a cabo el cribado de más de 160 compuestos tanto en promastigotes y amastigotes de *Leishmania*, como en células Jurkat y THP-1 humanas.
4. De todos los compuestos ensayados, 15 muestran índices de selectividad mejores que los de miltefosina y edelfosina en los ensayos en cultivos axénicos.
5. De estos 15 compuestos, 3 de ellos, las sales de azaquinilizinio **EBM-70a**, **EBM-F002** y **EBM-F003** presentan una actividad leishmanicida igual o mayor que la de la edelfosina en macrófagos humanos infectados con amastigotes. Esta alta actividad se complementa con una baja o nula citotoxicidad frente a células THP-1 diferenciadas a macrófagos.
6. El glutámico 436 (E436) es un residuo clave que puede ser considerado un *hot-spot* en la dimerización de la tripanotión reductasa (TryR).
7. Hemos puesto a punto un ensayo que nos permite determinar la capacidad de pequeñas moléculas para inhibir la dimerización de proteínas.
8. El péptido Ac-PEIIQSVGISMKM-Amd inhibe la dimerización y, tal y como esperábamos, la actividad de la TryR.
9. Dicho péptido ejerce una actividad leishmanicida en macrófagos humanos infectados con amastigotes.
10. La cisteína 444 (C444) podría actuar como un sensor biológico redox en tripanosomátidos.









## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO - Leishmaniasis [Internet]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
2. Manson-Bahr PEC. Old world leishmaniasis. ; 1996 p. 206-217 In F. E. G. Cox (ed.), The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases. *The Wellcome Trust*, London, United Kingdom. .
3. Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002 Oct;15(4):595-612.
4. Elliott J. Report on epidemic and remittent fever occurring in parts of Burdwan and Neddea divisions. ; 1863 p. 1-23 Bengal Secretarial Office, Calcutta, India.
5. Wenyon CM. Protozoology. *A manual for medical men, veterinarians and zoologists*. ; 1926 *Ballière and Co.*, London, United Kingdom. .
6. Kean BH, Mott KE, Russell AJ. *Tropical medicine and parasitology: Classic investigations*. ; 1978 Cornell University Press, Ithaca, N.Y. .
7. Wright JH. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). *J Med Res* 1903 Dec;10(3):472,482.7.
8. Hoare CA. Early discoveries regarding the parasites of oriental sore. ; 1938 *R. Soc. Trop. Med. Hyg. Report* nr 32.
9. Donovan C. The etiology of the heterogeneous fevers in India. *Br Med J* 1903;ii:1401.
10. Altamirano AJ. Comprometiendo la estructura osteo-facial de las poblaciones humanas del antiguo Perú por la leishmaniasis tegumentaria de forma mucosa y su significado cultural. ; 2000 Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Escola Nacional de Saúde Pública. 213 p.
11. Calvopina M, Armijos RX, Hashiguchi Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge -- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004 Nov;99(7):663-72.
12. Lipoldova M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet* 2006 Apr;7(4):294-305.
13. Vianna G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. *Bras Med* 1911;25:411.
14. Sergent E, Sergent E, Parrott L, Donatien A, Beguet M. Transmission du cloude biskra par le phlébotome (*phlebotomus papatasi* scop.). *C R Seanc Soc Biol* 1921;73:1030.
15. Adler S, Ber M. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. *Indian J Med Res* 1941;29:803.
16. Bray RS. *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 1974;28(0):189-217.

17. Lumsden WH. Letter: Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1974;68(1):74-5.
18. Pratt DM, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between new world species of *Leishmania*. *Nature* 1981 Jun 18;291(5816):581-3.
19. Lainson R, Shaw JJ. The leishmaniasis in biology and medicine. In: W. Peters and R. Killick-Kendrick; 1987. .
20. Chance ML, Peters W, Shchory L. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. observations on DNA. *Ann Trop Med Parasitol* 1974 Sep;68(3):307-16.
21. Kreuzer RD, Christensen HA. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am J Trop Med Hyg* 1980 Mar;29(2):199-208.
22. Simpson L, Simpson AM, Kidane G, Livingston L, Spithill TW. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *Am J Trop Med Hyg* 1980 Sep;29(5 Suppl):1053-63.
23. Arnot DE, Barker DC. Biochemical identification of cutaneous leishmaniasis by analysis of kinetoplast DNA. II. sequence homologies in leishmania kDNA. *Mol Biochem Parasitol* 1981 May;3(1):47-56.
24. Miles MA, Lainson R, Shaw JJ, Povoia M, de Souza AA. Leishmaniasis in Brazil: XV. biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis*--aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the amazon basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981;75(4):524-9.
25. de Ibarra AA, Howard JG, Snary D. Monoclonal antibodies to *Leishmania tropica major*: Specificities and antigen location. *Parasitology* 1982 Dec;85 (Pt 3)(Pt 3):523-31.
26. Handman E, Curtis JM. *Leishmania tropica*: Surface antigens of intracellular and flagellate forms. *Exp Parasitol* 1982 Oct;54(2):243-9.
27. Wirth DF, Pratt DM. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 Nov;79(22):6999-7003.
28. Anthony RL, Williams KM, Sacci JB, Rubin DC. Subcellular and taxonomic specificity of monoclonal antibodies to new world *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 1985 Nov;34(6):1085-94.
29. Saravia NG, Holguin AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am J Trop Med Hyg* 1985 Jul;34(4):714-20.
30. Barker DC, Gibson LJ, Kennedy WP, Nasser AA, Williams RH. The potential of using recombinant DNA species-specific probes for the identification of tropical *Leishmania*. *Parasitology* 1986;92 Suppl:S139-74.

31. Le Blancq SM, Cibulskis RE, Peters W. *Leishmania* in the old world: 5. Numerical analysis of isoenzyme data. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80(4):517-24.
32. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;65(3):111-25.
33. Control of the leishmaniases. Report of a WHO expert committee. World Health Organ Tech Rep Ser 1990;793:1-158.
34. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniases: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 2007;64:1-109.
35. Banuls AL, Jonquieres R, Guerrini F, Le Pont F, Barrera C, Espinel I, Guderian R, Echeverria R, Tibayrenc M. Genetic analysis of *Leishmania* parasites in Ecuador: Are *Leishmania (viannia) panamensis* and *leishmania (V.) guyanensis* distinct taxa? *Am J Trop Med Hyg* 1999 Nov;61(5):838-45.
36. Banuls AL, Dujardin JC, Guerrini F, De Doncker S, Jacquet D, Arevalo J, Noel S, Le Ray D, Tibayrenc M. Is *Leishmania (viannia) peruviana* a distinct species? A MLEE/RAPD evolutionary genetics answer. *J Eukaryot Microbiol* 2000 May-Jun;47(3):197-207.
37. Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 2000 May;16(5):188-9.
38. Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology* 2001 Apr;122(Pt 4):393-403.
39. Cupolillo E, Aguiar Alves F, Brahim LR, Naiff MF, Pereira LO, Oliveira-Neto MP, Falqueto A, Grimaldi G, Jr. Recent advances in the taxonomy of the new world leishmanial parasites. *Med Microbiol Immunol* 2001 Nov;190(1-2):57-60.
40. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 Sep;27(5):305-18.
41. Noazin S, Khamesipour A, Moulton LH, Tanner M, Nasseri K, Modabber F, Sharifi I, Khalil EA, Bernal ID, Antunes CM, Smith PG. Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis: A meta-analysis. *Vaccine* 2009 Jul 30;27(35):4747-53.
42. Jalouk L, Al Ahmed M, Gradoni L, Maroli M. Insecticide-treated bednets to prevent anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo governorate, Syria: Results from two trials. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007 Apr;101(4):360-7.
43. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006 Jan;19(1):111-26.

44. Goodwin LG, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J* 1943 Jul;37(2):198-209.
45. Cunningham ML, Fairlamb AH. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani*. purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem* 1995 Jun 1;230(2):460-8.
46. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004 Sep 17;279(38):39925-32.
47. Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J Med Chem* 2009 Apr 23;52(8):2603-12.
48. Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: Past, present and future. *Trends Parasitol* 2003 May;19(5):232-9.
49. Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Dec;46(12):3731-8.
50. Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barrett MP, Madhubala R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2006 Jan;145(1):1-10.
51. Berman JD, Badaro R, Thakur CP, Wasunna KM, Behbehani K, Davidson R, Kuzoe F, Pang L, Weerasuriya K, Bryceson AD. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ* 1998;76(1):25-32.
52. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VP, Buffels R. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: A multicenter study. *Clin Infect Dis* 2003 Sep 15;37(6):800-4.
53. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003 Nov;19(11):502-8.
54. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2000 Nov;111(1):1-14.
55. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 Apr;51(4):1425-30.
56. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002 Nov 28;347(22):1739-46.

57. Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, Pandey K, Das VR, Kumar N, Lal C, Verma N, Singh VP, Ranjan A, Verma RB, Anders G, Sindermann H, Ganguly NK. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 2007 Aug 15;196(4):591-8.
58. Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, Castanys S, Gamarro F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* 2006 Feb-Apr;9(1-2):26-39.
59. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: Potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 2003 Feb;126(2):129-42.
60. Yeates C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter reed army institute). *Curr Opin Investig Drugs* 2002 Oct;3(10):1446-52.
61. Lopez-Martin C, Perez-Victoria JM, Carvalho L, Castanys S, Gamarro F. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Nov;52(11):4030-6.
62. Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: A review. *Med Vet Entomol* 1990 Jan;4(1):1-24.
63. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 1999 May-Jun;17(3):279-89.
64. Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* 2004 Sep;4(6):601-9.
65. Shaw J. Ecological and evolutionary pressures on leishmanial parasites. *Brazilian Journal of Genetics* 1997;20:123.
66. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994 Jul-Sep;89(3):435-43.
67. Zijlstra EE, el-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 Apr;95 Suppl 1:S27-58.
68. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004 Dec 1;173(11):6521-5.
69. Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol* 2009 Nov;25(11):505-10.

70. Jochim RC, Teixeira C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol* 2009 Apr;25(4):145-7.
71. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:719361.
72. Riera C, Fisa R, Udina M, Gallego M, Portus M. Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004 Feb;98(2):102-10.
73. Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2002 Apr;66(4):334-7.
74. le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D, Kubar J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol* 1999 Jun;37(6):1953-7.
75. Sharma MC, Gupta AK, Das VN, Verma N, Kumar N, Saran R, Kar SK. *Leishmania donovani* in blood smears of asymptomatic persons. *Acta Trop* 2000 Sep 18;76(2):195-6.
76. Basu MK, Ray M. Macrophage and *Leishmania*: An unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol* 2005;31(3):145-54.
77. Klein J, Sato A. The HLA system. first of two parts. *N Engl J Med* 2000 Sep 7;343(10):702-9.
78. Zinkernagel RM, Hengartner H. Regulation of the immune response by antigen. *Science* 2001 Jul 13;293(5528):251-3.
79. Dennert G. Evidence for non-identity of T killer and T helper cells sensitised to allogeneic cell antigens. *Nature* 1974 May 24;249(455):358-60.
80. Kisielow P, Hirst JA, Shiku H, Beverley PC, Hoffman MK, Boyse EA, Oettgen HF. Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature* 1975 Jan 17;253(5488):219-20.
81. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
82. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 1989 Jan 1;169(1):59-72.
83. Reiner SL, Wang ZE, Hatam F, Scott P, Locksley RM. TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science* 1993 Mar 5;259(5100):1457-60.

84. Reed SG, Scott P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr Opin Immunol* 1993 Aug;5(4):524-31.
85. Sundar S, Reed SG, Sharma S, Mehrotra A, Murray HW. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1997 May;56(5):522-5.
86. Antoine JC, Prina E, Courret N, Lang T. *Leishmania* spp.: On the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv Parasitol* 2004;58:1-68.
87. Kemp M, Hey AS, Kurtzhals JA, Christensen CB, Gaafar A, Mustafa MD, Kordofani AA, Ismail A, Kharazmi A, Theander TG. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1994 Jun;96(3):410-5.
88. Ajdary S, Alimohammadian MH, Eslami MB, Kemp K, Kharazmi A. Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun* 2000 Apr;68(4):1760-4.
89. Kemp K. Cytokine-producing T cell subsets in human leishmaniasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000;48(3):173-6.
90. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1985 Dec;135(6):4144-8.
91. Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994 Mar;62(3):837-42.
92. Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ben Ismail R, Dellagi K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis* 1998 Jun;177(6):1687-95.
93. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002 Dec;70(12):6734-40.
94. Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 1993 Jul;92(1):324-9.
95. Kenney RT, Sacks DL, Gam AA, Murray HW, Sundar S. Splenic cytokine responses in Indian Kala-azar before and after treatment. *J Infect Dis* 1998 Mar;177(3):815-8.



96. Kemp M, Kurtzhals JA, Bendtzen K, Poulsen LK, Hansen MB, Koech DK, Kharazmi A, Theander TG. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 1993 Mar;61(3):1069-73.
97. Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major friedlin* chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 2003 May;11(5):1291-9.
98. Worthey EA, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Aggarwal G, Cawthra J, Fazelinia G, Fong C, Fu G, Hassebrock M, Hixson G, Ivens AC, Kiser P, Marsolini F, Rickel E, Salavati R, Sisk E, Sunkin SM, Stuart KD, Myler PJ. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Res* 2003 Jul 15;31(14):4201-10.
99. Martinez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 2004 Apr;3(2):506-17.
100. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciaroni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Dueterhoeft A, Fazelinia G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005 Jul 15;309(5733):436-42.
101. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 2007 Jul;39(7):839-47.
102. Clayton CE. Life without transcriptional control? from fly to man and back again. *EMBO J* 2002 Apr 15;21(8):1881-8.
103. Argaman M, Aly R, Shapira M. Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated post-transcriptionally. *Mol Biochem Parasitol* 1994 Mar;64(1):95-110.

104. Charest H, Zhang WW, Matlashewski G. The developmental expression of leishmania donovani A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 1996 Jul 19;271(29):17081-90.
105. Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 2000 Sep;110(1):79-91.
106. Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulou B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 2000 Oct;110(2):345-57.
107. Kelly BL, Nelson TN, McMaster WR. Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of *L. major* leishmanolysin genes (GP63). *Mol Biochem Parasitol* 2001 Aug;116(1):101-4.
108. Zilka A, Garlapati S, Dahan E, Yaolsky V, Shapira M. Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 2001 Dec 21;276(51):47922-9.
109. Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou B. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 2002 May 31;277(22):19511-20.
110. Myung KS, Beetham JK, Wilson ME, Donelson JE. Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 2002 May 10;277(19):16489-97.
111. Folgueira C, Quijada L, Soto M, Abanades DR, Alonso C, Requena JM. The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem* 2005 Oct 21;280(42):35172-83.
112. McNicoll F, Muller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dube M, Papadopoulou B. Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 2005 Oct 21;280(42):35238-46.
113. Myler PJ, Fasel N. *Leishmania* : After the genome. Norfolk, UK: *Caister Academic*; 2008. .
114. Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. Presence of a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its localization to a different compartment from the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem J* 1999 Jun 15;340 ( Pt 3)(Pt 3):759-66.
115. de Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 2002 Dec;88(12):1013-25.

116. Moreno SN, Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* 2003 Aug;6(4):359-64.
117. Michels PA, Hannaert V, Bringaud F. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today* 2000 Nov;16(11):482-9.
118. Hart DT, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: Energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol* 1982 Dec;54(3):397-409.
119. Coombs GH, Tetley L, Moss VA, Vickerman K. Three dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections. *Parasitology* 1986 Feb;92 ( Pt 1)(Pt 1):13-23.
120. Tetley L, Vickerman K. The glycosomes of trypanosomes: Number and distribution as revealed by electron spectroscopic imaging and 3-D reconstruction. *J Microsc* 1991 Apr;162(Pt 1):83-90.
121. Mottram JC, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: Enzyme activities of amastigotes and promastigotes and their inhibition by antimonials and arsenicals. *Exp Parasitol* 1985 Apr;59(2):151-60.
122. Mottram JC, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: Subcellular distribution of enzymes in amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol* 1985 Jun;59(3):265-74.
123. Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ. Glutaredoxin: Role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxid Redox Signal* 2005 Mar-Apr;7(3-4):348-66.
124. Lillig CH, Holmgren A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2007 Jan;9(1):25-47.
125. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Bohme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM. The genome of the African *Trypanosoma trypanosoma brucei*. *Science* 2005 Jul 15;309(5733):416-22.
126. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell

- DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005 Jul 15;309(5733):409-15.
127. Hunter WN, Alphey MS, Bond CS, Schuttelkopf AW. Targeting metabolic pathways in microbial pathogens: Oxidative stress and anti-folate drug resistance in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans* 2003 Jun;31(Pt 3):607-10.
128. Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* 2008 Nov;1780(11):1236-48.
129. Linares GE, Ravaschino EL, Rodriguez JB. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem* 2006;13(3):335-60.
130. Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 1992;46:695-729.
131. Gorin G, Esfandi A, Guthrie GB, Jr. Glutathione: Its reaction with NADP and its oxidation-reduction potential. *Arch Biochem Biophys* 1975 Jun;168(2):450-4.
132. Gilbert HF. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1990;63:69-172.
133. Moutiez M, Meziane-Cherif D, Aumercier M, Sergheraert C, Tartar A. Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. *Chem Pharm Bull* 1994;42(12):2641.
134. Kosower EM. Structure and reactions of thiols with special emphasis on glutathione. In: D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramović, editors. Glutathione part A: Chemical, biochemical and medical aspects. New York, USA: John Wiley & Sons; 1989. .
135. Fraser-L'Hostis C, Defrise-Quertain F, Coral D, Deshusses J. Regulation of the intracellular pH in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. *Biol Chem* 1997 Sep;378(9):1039-46.
136. Sousa Silva M, Ferreira AE, Tomas AM, Cordeiro C, Ponces Freire A. Quantitative assessment of the glyoxalase pathway in *Leishmania infantum* as a therapeutic target by modelling and computer simulation. *FEBS J* 2005 May;272(10):2388-98.
137. Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 2001 Jul;115(2):189-98.

138. Bocedi A, Dawood KF, Fabrini R, Federici G, Gradoni L, Pedersen JZ, Ricci G. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. *FASEB J* 2010 Apr;24(4):1035-42.
139. Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J* 1997 May 15;16(10):2590-8.
140. Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: A novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science* 1985 Mar 22;227(4693):1485-7.
141. Flohe L, Hecht HJ, Steinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic Biol Med* 1999 Nov;27(9-10):966-84.
142. Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Mol Microbiol* 2000 Feb;35(3):542-52.
143. Tovar J, Wilkinson S, Mottram JC, Fairlamb AH. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. *Mol Microbiol* 1998 Jul;29(2):653-60.
144. Dormeyer M, Reckenfelderbaumer N, Ludemann H, Krauth-Siegel RL. Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 2001 Apr 6;276(14):10602-6.
145. Williams CHJ. Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase and mercuric ion reductase-a family of flavoenzyme transhydrogenases. In: F. Müller, editor. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992. .
146. Flohe L. The Achilles' heel of trypanosomatids: Trypanothione-mediated hydroperoxide metabolism. *Biofactors* 1998;8(1-2):87-91.
147. Lohrer H, Krauth-Siegel RL. Purification and characterization of lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem* 1990 Dec 27;194(3):863-9.
148. Shames SL, Fairlamb AH, Cerami A, Walsh CT. Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases. *Biochemistry* 1986 Jun 17;25(12):3519-26.
149. Shames SL, Kimmel BE, Peoples OP, Agabian N, Walsh CT. Trypanothione reductase of *Trypanosoma congolense*: Gene isolation, primary sequence determination, and comparison to glutathione reductase. *Biochemistry* 1988 Jul 12;27(14):5014-9.

150. Bradley M, Bucheler US, Walsh CT. Redox enzyme engineering: Conversion of human glutathione reductase into a trypanothione reductase. *Biochemistry* 1991 Jun 25;30(25):6124-7.
151. Krauth-Siegel RL, Enders B, Henderson GB, Fairlamb AH, Schirmer RH. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *Eur J Biochem* 1987 Apr 1;164(1):123-8.
152. Hunter WN, Smith K, Derewenda Z, Harrop SJ, Habash J, Islam MS, Helliwell JR, Fairlamb AH. Initiating a crystallographic study of trypanothione reductase. *J Mol Biol* 1990 Nov 20;216(2):235-7.
153. Kuriyan J, Kong XP, Krishna TS, Sweet RM, Murgolo NJ, Field H, Cerami A, Henderson GB. X-ray structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Oct 1;88(19):8764-8.
154. Schmidt A, Krauth-Siegel RL. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr Top Med Chem* 2002 Nov;2(11):1239-59.
155. Schirmer RH, Müller JG, Krauth-Siegel RL. Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: The design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew Chem Int Ed* 1995;34(2):141.
156. Martyn DC, Jones DC, Fairlamb AH, Clardy J. High-throughput screening affords novel and selective trypanothione reductase inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2007 Mar 1;17(5):1280-3.
157. Spinks D, Shanks EJ, Cleghorn LA, McElroy S, Jones D, James D, Fairlamb AH, Frearson JA, Wyatt PG, Gilbert IH. Investigation of trypanothione reductase as a drug target in *Trypanosoma brucei*. *ChemMedChem* 2009 Dec;4(12):2060-9.
158. Cavalli A, Lizzi F, Bongarzone S, Belluti F, Piazzi L, Bolognesi ML. Complementary medicinal chemistry-driven strategies toward new antitrypanosomal and antileishmanial lead drug candidates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010 Feb;58(1):51-60.
159. Venkatesan SK, Shukla AK, Dubey VK. Molecular docking studies of selected tricyclic and quinone derivatives on trypanothione reductase of *Leishmania infantum*. *J Comput Chem* 2010 Mar 25.
160. Muller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol* 2003 Jul;19(7):320-8.
161. Li Z, Fennie MW, Ganem B, Hancock MT, Kobaslija M, Rattendi D, Bacchi CJ, O'Sullivan MC. Polyamines with N-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2001 Jan 22;11(2):251-4.

162. Keskin O, Ma B, Rogale K, Gunasekaran K, Nussinov R. Protein-protein interactions: Organization, cooperativity and mapping in a bottom-up systems biology approach. *Phys Biol* 2005 Jun;2(2):S24-35.
163. Arkin M. Protein-protein interactions and cancer: Small molecules going in for the kill. *Curr Opin Chem Biol* 2005 Jun;9(3):317-24.
164. Restle T, Muller B, Goody RS. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. A target for chemotherapeutic intervention. *J Biol Chem* 1990 Jun 5;265(16):8986-8.
165. Divita G, Restle T, Goody RS, Chermann JC, Baillon JG. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization using synthetic peptides derived from the connection domain. *J Biol Chem* 1994 May 6;269(18):13080-3.
166. Divita G, Baillon JG, Rittinger K, Chermann JC, Goody RS. Interface peptides as structure-based human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitors. *J Biol Chem* 1995 Dec 1;270(48):28642-6.
167. Morris MC, Robert-Hebmann V, Chaloin L, Mery J, Heitz F, Devaux C, Goody RS, Divita G. A new potent HIV-1 reverse transcriptase inhibitor. A synthetic peptide derived from the interface subunit domains. *J Biol Chem* 1999 Aug 27;274(35):24941-6.
168. Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis* 2006 Feb;11(2):161-71.
169. Hoyer C, Zander D, Fleischer S, Schilhabel M, Kroener M, Platzer M, Clos J. A *Leishmania donovani* gene that confers accelerated recovery from stationary phase growth arrest. *Int J Parasitol* 2004 Jun;34(7):803-11.
170. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994 Nov 11;22(22):4673-80.
171. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006 Jan 15;22(2):195-201.
172. Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* 2009 Jan;37(Database issue):D387-92.
173. Hubbard SJ, Thornton JM. NACCESS [computer program]. 1993. .
174. Case DA, Darden TA, Cheatham III TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Walker RC, Zhang W, Merz R.B.P., Wang B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Kolossváry I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Cai Q, Ye X, Wang J, Hsieh M-, Cui G, Roe

DR, Mathews DH, Seetin MG, Sagui C, Babin V, Luchko T, Gusarov S, Kovalenko A, Kollman PA. AMBER 11 [computer program]. University of California, San Francisco: 2010. .

175. Hamilton CJ, Saravanamuthu A, Eggleston IM, Fairlamb AH. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: Substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochem J* 2003 Feb 1;369(Pt 3):529-37.
176. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 2000 Mar;78(3):1606-19.
177. Fricker SP, Mosi RM, Cameron BR, Baird I, Zhu Y, Anastassov V, Cox J, Doyle PS, Hansell E, Lau G, Langille J, Olsen M, Qin L, Skerlj R, Wong RS, Santucci Z, McKerrow JH. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. *J Inorg Biochem* 2008 Oct;102(10):1839-45.
178. Navarro M, Cisneros-Fajardo EJ, Sierralta A, Fernandez-Mestre M, Silva P, Arrieche D, Marchan E. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. *J Biol Inorg Chem* 2003 Apr;8(4):401-8.
179. Arias A. Determinación del proceso de muerte celular inducido por los compuestos ebselen y edelfosina en el parásito protozoo *Leishmania infantum*. ; 2008.
180. Culha G, Yalin E, Sanguen K. Alterations in serum levels of trace elements in cutaneous leishmaniasis patients in endemic region of Hatay (Antioch). *Asian J Chem* 2008;20(4):3104.
181. Araujo AP, Rocha OG, Mayrink W, Machado-Coelho GL. The influence of copper, selenium and zinc on the response to the Montenegro skin test in subjects vaccinated against American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008 Jan;102(1):64-9.
182. de Souza AP, Melo de Oliveira G, Neve J, Vanderpas J, Pirmez C, de Castro SL, Araujo-Jorge TC, Rivera MT. *Trypanosoma cruzi*: Host selenium deficiency leads to higher mortality but similar parasitemia in mice. *Exp Parasitol* 2002 Aug;101(4):193-9.
183. de Souza AP, de Oliveira GM, Vanderpas J, de Castro SL, Rivera MT, Araujo-Jorge TC. Selenium supplementation at low doses contributes to the decrease in heart damage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Res* 2003 Sep;91(1):51-4.
184. Plano D, Sanmartin C, Moreno E, Prior C, Calvo A, Palop JA. Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2007 Dec 15;17(24):6853-9.
185. Sanmartin C, Plano D, Palop JA. Selenium compounds and apoptotic modulation: A new perspective in cancer therapy. *Mini Rev Med Chem* 2008 Sep;8(10):1020-31.
186. Sanmartin C, Plano D, Dominguez E, Font M, Calvo A, Prior C, Encio I, Palop JA. Synthesis and pharmacological screening of several aroyl and heteroaroyl selenylacetic acid derivatives as cytotoxic and antiproliferative agents. *Molecules* 2009 Sep 1;14(9):3313-38.



187. Madhunapantula SV, Desai D, Sharma A, Huh SJ, Amin S, Robertson GP. PBISe, a novel selenium-containing drug for the treatment of malignant melanoma. *Mol Cancer Ther* 2008 May;7(5):1297-308.
188. Sharma A, Sharma AK, Madhunapantula SV, Desai D, Huh SJ, Mosca P, Amin S, Robertson GP. Targeting Akt3 signaling in malignant melanoma using isoselenocyanates. *Clin Cancer Res* 2009 Mar 1;15(5):1674-85.
189. Das A, Bortner J, Desai D, Amin S, El-Bayoumy K. The selenium analog of the chemopreventive compound S,S'-(1,4-phenylenebis[1,2-ethanediyl])bisothioureia is a remarkable inducer of apoptosis and inhibitor of cell growth in human non-small cell lung cancer. *Chem Biol Interact* 2009 Jul 15;180(2):158-64.
190. Emmert SW, Desai D, Amin S, Richie JP, Jr. Enhanced Nrf2-dependent induction of glutathione in mouse embryonic fibroblasts by isoselenocyanate analog of sulforaphane. *Bioorg Med Chem Lett* 2010 Apr 15;20(8):2675-9.
191. Fuertes MA, Nguewa PA, Castilla J, Alonso C, Perez JM. Anticancer compounds as leishmanicidal drugs: Challenges in chemotherapy and future perspectives. *Curr Med Chem* 2008;15(5):433-9.
192. da Silva DB, Tulli EC, Militao GC, Costa-Lotufo LV, Pessoa C, de Moraes MO, Albuquerque S, de Siqueira JM. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *duguetia furfuracea*. *Phytomedicine* 2009 Nov;16(11):1059-63.
193. Palumbo E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: A brief review. *Braz J Infect Dis* 2008 Feb;12(1):2-4.
194. Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, Yang R, Cieplak P, Luo R, Lee T, Caldwell J, Wang J, Kollman P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem* 2003 Dec;24(16):1999-2012.
195. Onufriev A, Bashford D, Case DA. A modification of the generalized born model suitable for macromolecules. *J Phys Chem* 2000(104):3712.
196. Sitfoff D, Sharp K, Honig B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J Phys Chem* 1994(98):1978.
197. Sluis-Cremer N, Hamamouch N, San Felix A, Velazquez S, Balzarini J, Camarasa MJ. Structure-activity relationships of [2',5'-bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-beta-D-ribofuranosyl]-3'-spiro-5'-(4'-amino-1',2'-oxathiole-2',2'-dioxide)thymine derivatives as inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase dimerization. *J Med Chem* 2006 Aug 10;49(16):4834-41.
198. WHO - Control of Neglected Tropical Diseases [Internet]. Available from: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/).

199. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, Sachs JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med* 2006 Jan;3(5):e102.
200. Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, de Cozar C, Alvarez E, Lavandera JL, Vanderwall DE, Green DV, Kumar V, Hasan S, Brown JR, Peishoff CE, Cardon LR, Garcia-Bustos JF. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* 2010 May 20;465(7296):305-10.
201. Alzate JF, Arias A, Mollinedo F, Rico E, de la Iglesia-Vicente J, Jimenez-Ruiz A. Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 Oct;52(10):3779-82.
202. Guillon J, Forfar I, Mamani-Matsuda M, Desplat V, Saliege M, Thiolat D, Massip S, Tabourier A, Leger JM, Dufaure B, Haumont G, Jarry C, Mossalayi D. Synthesis, analytical behaviour and biological evaluation of new 4-substituted pyrrolo[1,2-a]quinoxalines as antileishmanial agents. *Bioorg Med Chem* 2007 Jan 1;15(1):194-210.
203. Camarasa MJ, Velazquez S, San-Felix A, Perez-Perez MJ. TSAO derivatives the first non-peptide inhibitors of HIV-1 RT dimerization. *Antivir Chem Chemother* 2005;16(3):147-53.
204. Camarasa MJ, Velazquez S, San-Felix A, Perez-Perez MJ, Gago F. Dimerization inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase, protease and integrase: A single mode of inhibition for the three HIV enzymes? *Antiviral Res* 2006 Sep;71(2-3):260-7.
205. Sakai K, Yokote H, Murakami-Murofushi K, Tamura T, Saijo N, Nishio K. Pertuzumab, a novel HER dimerization inhibitor, inhibits the growth of human lung cancer cells mediated by the HER3 signaling pathway. *Cancer Sci* 2007 Sep;98(9):1498-503.
206. Kristjansdottir K, Dizon D. HER-dimerization inhibitors: Evaluating pertuzumab in women's cancers. *Expert Opin Biol Ther* 2010 Feb;10(2):243-50.
207. Bailey S, Fairlamb AH, Hunter WN. Structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.6 Å resolution; enzyme-NADP interactions at 2.8 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994 Mar 1;50(Pt 2):139-54.
208. Zhang Y, Bond CS, Bailey S, Cunningham ML, Fairlamb AH, Hunter WN. The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Sci* 1996 Jan;5(1):52-61.