



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**Nuevas dianas en el diseño de fármacos contra la  
leishmaniasis**

Autor: Amalia Pérez Rodríguez

Fecha: 30 de junio del 2020

Tutor: José Carlos Menéndez Ramos.

# Índice

1 Resumen.....	3
2 Introducción.....	3
3 Objetivos.....	5
4 Material y métodos.....	6
5 Resultados y discusión.....	6
Enzimas de la biosíntesis de poliaminas.....	6
Metabolismo de tioles.....	7
Enzimas del metabolismo de los folatos.....	11
Metabolismo de las purinas.....	13
Quinasas.....	14
Metabolismo energético.....	17
Proteasas.....	17
6 Conclusiones.....	19
7 Bibliografía.....	19

## 1 Resumen

La leishmaniasis es una de las enfermedades infecciosas con mayor relevancia a nivel mundial y está incluida entre las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs). Aunque existen tratamientos como el estilbogluconano sódico, el antimonio de meglumina o la miltefosina, entre otros, tienen efectos adversos y, en ocasiones, son ineficaces a causa de la aparición de resistencias. Por estos motivos, se están estudiando estructural y funcionalmente nuevas dianas como las enzimas del sistema redox (tripanotona reductasa, tripanotona sintasa), del metabolismo de los folatos (dihidrofolato reductasa, timidilato sintasa, pteridina reductasa-1), del metabolismo energético (manosiltransferasas y fosforilasas), proteasas (cisteína proteasa B), quinasas (MAPK, GSK-3, CRK), etc. Se han identificado algunos compuestos con capacidad leishmanicida que inhiben a alguna de estas enzimas como el K11777, el flavipiridol, el purvalanol, algunas flavonas, el NVP-BGT226 y la witaferina A, entre otros, que son prometedores como futuros agentes terapéuticos, aunque todavía se han de seguir estudiando y optimizando.

**Palabras clave:** Leishmaniasis, dianas terapéuticas, innovación.

## 2 Introducción

Con una estimación de entre 700 000 y un millón de nuevos casos y entre 26 000 y 65 000 defunciones, cada año, según la OMS, la leishmaniasis se ha convertido en una de las patologías infecciosas más relevantes a nivel mundial, principalmente, en países donde la pobreza, la malnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda, la debilidad del sistema inmunitario y la falta de recursos son el pan de cada día (1).

Es un conjunto de enfermedades causadas por un protozoo parásito del género *Leishmania*, cuya forma de transmisión puede ser por zoonosis (siendo el perro el principal reservorio) o antropozoonosis a través a la picadura de flebotomos hembra infectados de los géneros *Lutzomyia* o *Phlebotomus*, dependiendo de si se trata del nuevo o el viejo mundo, respectivamente. Estos protozoos tienen un ciclo biológico dimórfico (2)(3)(4), en el cual la forma flagelada o promastigote, evade la acción del complemento en el torrente sanguíneo entrando en las células del sistema fagocítico mononuclear a través del reconocimiento de ligandos de la superficie del parásito por los receptores de membrana de los macrófagos. Un vez dentro, ya en una forma no flagelada o amastigote se multiplica dentro de una vacuola parasitófora. Un vez que se han reproducido en gran medida, se produce la lisis del macrófago y la consiguiente infección de otros nuevos (4).

Dependiendo del tipo de de respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador y la especie de *Leishmania* infectante, podemos distinguir tres formas principales de la enfermedad:

**-Leishmaniasis cutánea:** es la más frecuente y no es mortal. Está relacionada con una respuesta de tipo Th1 y la producen en torno a 20 especies de *Leishmania* como *L. brailiensis*, *L. tropica* (con la que se puede desarrollar leishmaniasis recidivante) o *L. amazonensis* (causa leishmaniasis cutánea difusa). Se caracteriza por la producción de lesiones cutáneas como ulceraciones que dan como resultado cicatrices, mutilaciones y desfiguraciones faciales, que conllevan un estigma y un problema social (4). Según la OMS: “Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 600 000 y 1 millón de casos nuevos” (1).

**-Leishmaniasis mucocutánea:** está causada por algunas especies del subgénero *Viannia*. Se produce una destrucción parcial o completa de las membranas de la mucosa de la nariz, boca y garganta. Según la OMS, más del 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea se producen en Brasil, Bolivia, Etiopía y el Perú (1)(4).

**-Leishmaniasis visceral:** también conocida como kala-azar es mortal en un 95% de los casos si no se trata. Está relacionada con una respuesta tipo Th2 y solo la producen dos especies: *L. donovani* y *L. infantum*. Esta última puede producir en algunos casos el desarrollo de una leishmaniasis cutánea post kala azar (PKDL). El kala-azar se caracteriza por afectar al bazo, a la médula ósea y al hígado, por lo que suele cursar con hepatoesplenomegalia, episodios de fiebre irregular, anemia y pérdida de peso (4). Según la OMS: “En 2017, más del 95% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en 10 países: Bangladesh, Brasil, China, Etiopía, India, Kenia, Nepal, Somalia, Sudán y Sudán del Sur y se estima que cada año se producen en el mundo entre 50 000 y 90 000 nuevos casos” (1).

Asimismo, debemos tener en cuenta que en zonas endémicas un gran porcentaje de los infectados son portadores asintomáticos, pudiendo variar la relación entre los casos de asintomáticos y los sintomáticos. Por ejemplo, se ha visto que en Kenia hay 4 asintomáticos por cada 1 sintomático mientras que en España la relación es de 50 asintomáticos por cada 1 sintomático. Esto es importante tenerlo en cuenta ya que en la actualidad se desconoce si estos son capaces de transmitir la enfermedad (4). Otro problema importante es la coinfección *Leishmania*-VIH debido a que estos pacientes no pueden luchar contra la infección debido a su inmunosupresión.

La leishmaniasis es una de las Enfermedades Tropicales Desatendidas (NTDs) más importantes debido a su amplio impacto en la salud de la sociedad y a lo limitado de su arsenal farmacoterapéutico, que además se caracteriza por su baja eficacia e inseguridad. Los más usados son los que vienen recogidos en la tabla 1 (2)(4)(5)(6).

Como se puede ver, los efectos adversos derivados de la administración de estos fármacos son muchos y graves, teniendo no solo repercusión en el paciente, sino a veces también en su descendencia, como es el caso de la miltefosina, para la cual es necesario seguir un tratamiento anticonceptivo durante y tras, al menos, dos meses después de tratamiento. El acceso tanto a esta medicación preventiva como al tratamiento en sí está comprometido en la mayoría de las poblaciones a las que afecta la leishmaniasis por razones de pobreza.

Por otro lado, debido a su alta polaridad, con valores de coeficiente de partición octanol/agua negativos y/o alto peso molecular ( $> 500$  Da) y, por lo tanto, incumpliendo la regla de los 5 de Lipinski, todos estos deben ser administrados vía parenteral, a excepción de la miltefosina, cuya vía de administración es oral (5).

Asimismo, vemos una distribución geográfica distinta en cuanto a la eficacia del tratamiento. En zonas como la India, el tratamiento con miltefosina, paramomicina o anfotericina B liposomal tienen una alta eficacia, mientras que en África, estos tratamientos, a excepción de la miltefosina, son ineficaces. Además, se ha visto la aparición de resistencias en la India para el estibogluconato sódico y el antimonio de meglumina, hecho que no se aprecia en otros lugares.

TABLA 1. Fármacos usados en el tratamiento de la leishmaniasis (2)(4)(5)(6).

Fármaco	Mecanismo de acción	Efectos adversos	Poblaciones en las que se usa	Poblaciones resistentes (R) o de baja eficacia (E)	Tipo de leishmaniasis para la que se usa
<b>Estibogluconato sódico</b>	Conversión del profármaco a un metabolito trivalente que altera el metabolismo de los tioles	Arritmia y hepatitis Inyecciones dolorosas	África	India (R)	LV, LC
<b>Antimoniato de meglumina</b>	Posible inhibición de la glucólisis y la B-oxidación de ácidos grasos en amastigotes	Inyecciones dolorosas Nefro y cardiotoxicidad Pancreatitis		India (R)	LC, LV
<b>Anfotericina B</b>	Formación de poros en la membrana que lleva a la salida de cationes fuera de la célula.	Tromboflebitis; ocasionalmente: miocarditis hipocalemia, disfunción renal y muerte			LC
<b>Anfotericina B liposomal</b>	Formación de poros en la membrana que lleva a la salida de cationes fuera de la célula.	Fiebre con rigor y escalofríos y náuseas. Nefrotoxicidad, hipocalemia y anafilaxia	India	África (E)	LV, LC
<b>Paramomicina</b>	Unión a la subunidad 30S del ribosoma, impidiendo la síntesis de proteínas	Ototoxicidad . Problemas en la función hepática y renal reversibles Inyecciones dolorosas	India	África (E)	LV
<b>Miltefosina</b>	Posible alteración del metabolismo de los alquil-fosfolípidos. Relacionado con la apoptosis y la citocromo C oxidasa	Teratogénico Alteraciones gastrointestinales y hepato-nefrotoxicidad	India África Nepal Alemania Colombia Bolivia		LV, LC
<b>Pentamidina®</b>	Alteración morfológica de la mitocondria y fragmentación del ADN kinetoplástico	Inductor de diabetes mellitus dependiente de insulina y toxicidad.			LC

Con el objetivo de disminuir estas resistencias, mejorar la eficacia, aumentar la seguridad y disminuir los efectos adversos y la duración del tratamiento, se están siguiendo varias vías de acción: las terapias combinadas, el desarrollo de nuevas formulaciones galénicas, el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad leishmanicida, bien de origen natural o sintético, por medio de técnicas de cribado (*screening*); y la búsqueda de nuevas dianas que nos ayuden al diseño lógico de fármacos cada vez más selectivos y menos tóxicos. Es este último enfoque en el que nos vamos a centrar en este trabajo.

### 3 Objetivos

- Hacer una recopilación de las dianas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis en las que se está trabajando.
- Señalar otras dianas terapéuticas menos conocidas, pero que son prometedoras para el desarrollo de inhibidores.
- Citar algunos de los compuestos con capacidad leishmanicida que han identificado o se están desarrollando, indicando su mecanismo de acción o interacción en los casos en que se conozca.

## 4 Material y métodos

Se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando artículos científicos, libros y webs oficiales que contengan información actualizada sobre el tema como El Sevier, Pubmed, WHO, etc.

## 5 Resultados y discusión

La disponibilidad de las secuencias completas del genoma de *Leishmania* ha supuesto una ventaja para la identificación de nuevas dianas o el conocimiento más profundo de otras ya conocidas. Si a esto le añadimos el desarrollo de técnicas analíticas y de cribado cada vez más avanzadas, el resultado es una puerta abierta para el diseño de fármacos contra la leishmaniasis. A continuación vamos a hablar de algunas de estas enzimas, agrupándolas por rutas metabólicas.

### *Enzimas de la biosíntesis de poliaminas*

El metabolismo de las poliaminas es esencial para la supervivencia del parásito, participando en procesos como la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas y el crecimiento y diferenciación celular. Asimismo, su producto final, la espermidina, es el precursor de la tripanotona, un tiol del que hablaremos más adelante (7) (8).

Las poliaminas son moléculas orgánicas de bajo peso molecular con al menos dos grupos amino distribuidos lo largo de su estructura y que se sintetizan a partir de aminoácidos (8). La arginasa, metaloenzima binuclear de Mn (II), representa el primer paso en la vía de síntesis y su cometido es la biosíntesis *de novo* de poliaminas al catalizar la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea. Se ha visto que los niveles de arginina, y, por tanto, la actividad de la arginasa, son importantes en el mantenimiento de la infección. Además, es esencial en la proliferación de promastigotes, aunque no en amastigotes. Asimismo, se han visto ciertas diferencias en la estructura tridimensional de estas enzimas dependiendo de la especie, lo que podría proporcionar inhibidores de arginasa específicos de cada especie y de cada isoenzima jugando con las interacciones moleculares enzima-inhibidor para conseguir mayor selectividad (7).

Algunos de los fármacos desarrollados con actividad inhibitoria de la arginasa en *L. mexicana*, como el ácido 2(S)-amino-6-borono-hexanoico (Ilustración 1), o en *L. amazonensis*, que consisten en distintos tipos de flavonoides como la quercetina, luteolina, fisetina, 7,8-hidroxiflavona, galato de epigalocatequina, catequina y epicatequina (estos tres últimos obtenidos del té verde). Gracias a la amplia ventana terapéutica de estos flavonoides se podrían usar como complementos alimenticios (7).

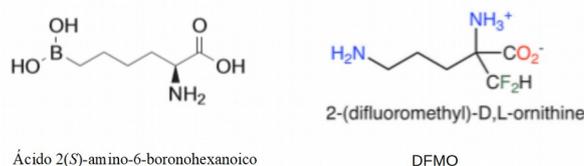


Ilustración 1: Ácido 2(S)-amino-6-borono-hexanoico y DFMO (7)(8)

Por otro lado tenemos la ornitina descarboxilasa (ODC), que convierte la L-ornitina en putrescina. Se ha visto que *L. donovani* puede conseguir suficiente L-ornitina del medio para crecer, pero no de putrescina y espermidina, por lo que se supuso que la inhibición de la ODC

y de la espermidina sintasa, siguiente enzima en la ruta metabólica, podrían ser buenas dianas para fármacos leishmanicidas. Sin embargo, a la hora de desarrollar inhibidores no se ha conseguido la eficacia deseada *in vivo*. Esto se debe a la existencia de rutas de salvamento y de transportadores de estos intermedios, así como a la sobreexpresión de ODC. Se probó la eficacia del DFMO (Ilustración 1), un inhibidor irreversible de la ODC que se une a la cisteína-30 del centro activo por enlace covalente usado contra *T. cruzi*. Sin embargo, debido a la sobreexpresión de ODC comentada se ha producido resistencia (8).

Otra enzima que participa en esta ruta es la S-adenosilmetionina descarboxilasa que produce S-adenosilmetionina descarboxilada, que actúa como donador de un grupo aminopropilo en la síntesis de espermidina. Gracias a estudios llevados a cabo en otros tripanosomátidos (*T. brucei* y *T. cruzi*) se ha determinado que codifican dos parálogos: uno (AdoMetDC) tiene los residuos del sitio activo y la capacidad autocatalítica y el otro (AdoMetDC prozima) es una pseudoenzima, pero para que haya actividad ambos deben formar un heterodímero (8). Según se ha visto en *T. brucei*, la concentración de prozima es muy baja en comparación con la de AdoMetDC. La inhibición química o supresión de la AdoMetDC produce un aumento en la expresión de la prozima y de la ODC y la supresión de la expresión de la prozima conlleva la inhibición en la actividad de la AdoMetDC y la disminución de los niveles de espermidina y de tripanotona, que se degradaría para compensar la pérdida de espermidina. Al ser suprimidos cualquiera de los dos parálogos, la respuesta del parásito siempre es la de conservar la concentración de espermidina lo más alta posible. La prozima no solo es un activador de AdoMetDC, sino que también tiene un papel modulador de las prolaminas en la célula (9).

En relación con la espermidina, tenemos a la deoxifusina sintasa (DHS) que transfiere la porción aminobutilo de la espermina a un residuo de lisina conservado del factor de elongación eIF5A, el cual participa en la síntesis de los tramos de poliprolina y promueve la terminación de la traducción. La DHS es un heterotetradímero formado por la unión de dos dímeros provenientes de dos parálogos. Uno es el DSHc, ya que cuenta con una lisina que interviene en la catálisis y tiene residuos que permiten la unión de la espermina; y el otro es el DHSp, que tiene los residuos para que se produzca la interacción con el NAD. Se ha visto que la alteración del bolsillo del NAD lleva a una pérdida de función en el sitio activo. Este enzima promete ser una buena diana, ya que es esencial y necesita la unión de dos parálogos para la formación del enzima activo, por lo que se puede trabajar en el desarrollo de inhibidores selectivos que no interfieran con las DHS humanas (8).

Otras dianas interesantes dentro de esta ruta serían una serie de transportadores específicos de leishmania como el transportador de putrescina y ornitina (LmPOT1) en *L. mexicana* o el transportador de alta afinidad específico de arginina (LdAAP3) en *L. donovani* (7).

### ***Metabolismo de tioles***

Esta ruta metabólica está implicada, como ya hemos comentado en el apartado anterior, en la protección contra el estrés oxidativo, manteniendo el balance endógeno de óxido-reducción, al proveer de equivalentes reductores. Estos son especialmente importantes en la biosíntesis de precursores de ADN y en la detoxificación de hidroperóxidos. La molécula básica para que esto se produzca es la tripanotona, por lo que una alteración en su biosíntesis o reciclaje tendrá un efecto negativo sobre el parásito (7).

La tripanotona (THS2) actúa sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS) o sobre las especies reactivas de nitrógeno (RNS) de forma indirecta. Su principal papel es reducir una oxidoreductasa de la familia de las tioredoxinas llamada triparedoxina (TXN), la cual se encarga de mantener reducidas a dos tiolperoxidasa: la 2-Cys-peroxidoredoxina (2-Cys-PRX) y la glutatión peroxidasa sin selenio (nsGPX). Por otro lado, y en menor medida, participa junto con la triparedoxina en la reducción de moléculas que no están directamente relacionadas con la eliminación de peróxidos, pero que tienen un papel relevante en la homeostasis redox del parásito (10).

La tripanotona [N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-bis-glutationilperimidina] está compuesta por dos unidades de glutatión y una de espermidina, las cuales se unen a través de dos reacciones secuenciales ATP-dependientes: la primera es catalizada por la glutatiónilperimidina sintetasa o por la tripanotona sintetasa (TryS), y la segunda, exclusivamente por la tripanotona sintetasa. La TryS presenta una serie de características que la convierten en una candidata ideal como diana de fármacos: es esencial para la supervivencia del parásito; está codificada por un solo gen y no tiene ninguna ruta metabólica auxiliar conocida, por lo que es difícil que presente resistencias; no está presente en mamíferos, así que la toxicidad sería mínima, en principio; y su mecanismo de acción y forma de unión a los sustratos está bien caracterizada. Algunos compuestos que han mostrado actividad frente a la TryS son los que se muestran a continuación en la Ilustración 2 (10).

MOL 2008 y FS-554 son análogos de ATP que inhiben competitivamente a la TryS de *L. infantum*. Tomatina, conesina, uvaol y betulina son inhibidores de la TryS de *L. donovani*, competitivos respecto a espermina y no-competitivos respecto a ATP. Todos actúan como inhibidores con respecto a glutatión, siendo esta inhibición no competitiva en el caso de tomatina y betulina, y alostérica en uvaol y conesina. PS-203 es una oxabicyclo[3.3.1]nonanona que inhibe competitivamente a la TryS y la tripanotona reductasa y tiene actividad frente a amastigotes de *L. donovani*. Todos los estudios con estos compuestos han sido realizados *in vitro*. Sin embargo, se ha de señalar que la actividad de estos compuestos depende de la especie de *Leishmania*, además de que su potencia *in vivo* podría ser menor a lo esperado debido a aspectos como la biodisponibilidad, la estabilidad o la capacidad de penetración en la célula, así como el hecho de que el parásito pueda sobrevivir con niveles de tripanotona muy bajos (10).

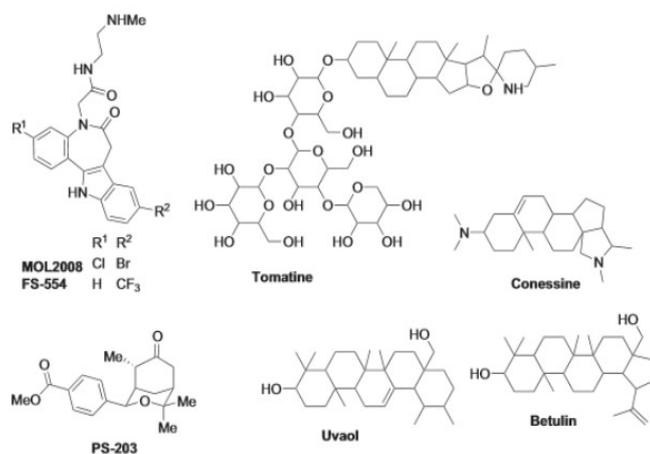


Ilustración 2: Inhibidores de la TryS (10)

La tripanotona oxidada (TS2) se reduce por medio de la tripanotona reductasa (TryR), una disulfito oxidoreductasa dependiente de FAD, utilizando el poder reductor del NADPH producido en la ruta de las pentosas fosfato. La TryR es esencial y, aunque pertenece a la misma familia que la glutatión reductasa de los mamíferos, se diferencian en su sitio activo al ser el de la TryR de mayor tamaño y con carga negativa, lo que permite selectividad a la hora de desarrollar fármacos inhibidores y, por lo tanto, una menor toxicidad asociada. A través de

métodos como cribado de alto rendimiento (*high-throughput screening*) y ensayos celulares, entre otros, se ha podido obtener una serie de compuestos con capacidad inhibitoria de la TryR, aunque ninguno ha demostrado potencia suficiente para pasar más allá de la fase de descubrimiento. Este fracaso en los ensayos *in vivo* se puede deber a que *Leishmania* puede sobrevivir con tan solo un 15% de la actividad de esta enzima. Un estudio llevado a cabo en *Trypanosoma cruzi*, otro tripanosomátido que comparte muchas características metabólicas con *Leishmania*, mostró que, debido a su alta capacidad de catálisis y a su abundancia, se necesita una inhibición del 98% para disminuir su actividad en un 50%. Por este motivo, los compuestos deben presentar una gran potencia, selectividad y concentración para que sean eficaces (10).

Relacionados con este enzima tenemos a los antimoniales. Aunque poco se sabe de su mecanismo de acción exacto, algunos estudios han demostrado que el Sb(III) actúan como inhibidor reversible y dependiente de tiempo de la tripanotona reductasa *in vitro*, por lo que impediría la regeneración del sistema redox al no poderse reducir los disulfitos. Asimismo, se ha visto una disminución en los niveles de tioles debido a un aumento de sus forma oxidada (TS2 y GSSG) en promastigotes y en amastigotes *ex vivo*; y a la elevación del eflujo hacia el medio externo, tanto de la tripanotona como del glutatión en promastigotes. Según se cree, estos disulfitos se unirían al Sb(III) y se formaría un complejo ternario [(GS)Sb(III) - (T[S]2)] que sería reconocido por la bomba de eflujo. Todo esto conlleva un reducción en la capacidad reguladora de los tiones a nivel intracelular, lo que afecta al potencial redox de los tioles. La reducción del potencial redox se ha relacionado con el paso a un estado apoptótico en el que se daría una externalización de fosfatidilserina y la fragmentación del ADN. El estrés oxidativo es un factor importante, por lo que la generación de especies reactivas de oxígeno mediada por los macrófagos, unida a la incapacidad del parásito para defenderse, podría ser la causa de la apoptosis. Asimismo, se ha visto el estado reductor de la célula también está relacionado con la regulación de la síntesis de desoxiribonucleótidos y la presencia de TS2 con la inhibición de la ribonucleótido reductasa (11).

Los antimoniales (Ilustración 3) se administran en su forma Sb(V), que será reducida a su forma activa Sb(III). No se conoce con exactitud el método de bioactivación ni si es el parásito o los macrófagos quien lo lleva a cabo. Según varios estudios, dicha reducción se llevaría a cabo por el parásito, concretamente por su forma amastigote. Esta hipótesis se debe a que recientemente se ha identificado una reductasa dependiente de tiol TDR1 que podría ser la responsable (11). Se trata de un enzima en forma de trímero que se cree que reduce el Sb(V) a Sb(III) al formar primero un intermedio junto con el glutatión (disulfóxido de 2-mercaptoetanol–glutatión. Esta enzima se encuentra más expresada en el amastigote y, además, se ha visto que en esta forma es más sensible al Sb(V) que la promastigote. Sin embargo, no se descarta la reducción por parte del macrófago (12).

También se ha sugerido que el Pentostam (SbV) estaría implicado en la inhibición de la oxidación de ácidos grasos y de la glicólisis, pero no se han identificado las dianas concretas sobre las que actuaría (11).

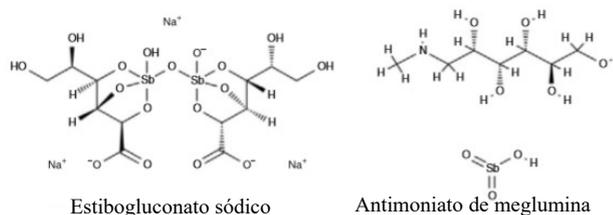


Ilustración 3: Estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina (6)

Otras enzimas en estudio y que podrían resultar interesantes en el desarrollo de fármacos son la triparredoxina (TXN), la 2-Cys-peroxirredoxina y la glutatión peroxidasa sin selenio. Las tiorredoxinas son una familia de proteínas antioxidantes de localización ubicua, con peso molecular de 14kD, termoestables, que están presentes en todos los organismos y cuyo centro activo está altamente conservado, con la secuencia de aminoácidos Trp-Cys-Gly/Pro-Pro-Cys (13); siendo los residuos de Cys los encargados de la actividad catalítica. Sin embargo, las triparredoxinas difieren bastante con éstas al ser de mayor tamaño, tener un centro activo con una configuración distinta y utilizar la THS2 como fuente de equivalentes reductores. Solo comparte un 13% de la identidad de la secuencia con las otras tiorredoxinas, por lo que representa una diana excelente para el desarrollo de fármacos selectivos. Además, es el paso limitante en el proceso de reducción de peróxidos. A pesar de su interés, apenas se han desarrollado fármacos que inhiban a esta enzima debido a que no es fácil diseñar ligandos reversibles debido a lo desestructurado que es su sitio de unión a sustratos; por este motivo, se cree que solo podrían desarrollarse inhibidores irreversibles de unión covalente a los residuos de cisteína de su superficie (7).

Algunos de los inhibidores desarrollados aparecen indicados en la Ilustración 4. Estos compuestos contienen un sustituyente clorometilo o cloroacetamido, necesario para la actividad inhibitoria, pero no suficiente por sí sola, por lo que se piensa que la estructura también tiene un papel. Se ha visto que son inhibidores tiempo-dependientes y que todos inhiben a la TXN covalentemente. En el caso de los compuestos 1, 2, 3, 4 y 5, se sabe que se da una interacción que modifica la cisteína 40 de la triparredoxina. Los compuestos 6 y 7 también inhiben a la TryR. El compuesto 2 inhibe además a peroxidasa. Algunos de los compuestos no reaccionaron con las tiorredoxinas humanas y, en el caso de los que lo hicieron, la interacción fue más lenta que con la triparredoxina, por lo que se puede esperar cierta selectividad (14).

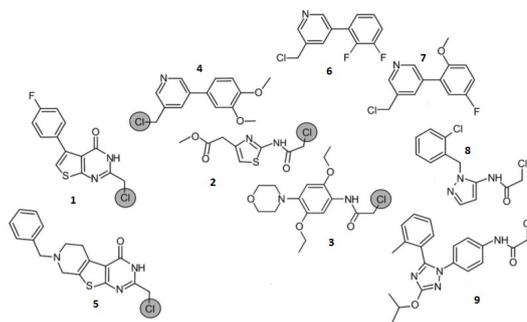


Ilustración 4: Inhibidores de la triparredoxina (14)

La 2-Cys-peroxirredoxina es una proteína con doble acción, peroxidasa y chaperona, dependiendo de su estado oligomérico. Como chaperona previene la agregación inducida por estrés y se ha visto que según su estructura oligomérica o actividad como chaperona puede interactuar con moléculas de la señalización como NF- $\kappa$ B, TLR4 y p53 (15). Se ha visto que su sobre expresión podría estar relacionada con la resistencia a antimoniales (al igual que TH<sub>2</sub>, TryR y TryS) y con una mayor virulencia y metástasis. La nsGPX está todavía poco estudiada en *Leishmania*, pero según estudios llevados a cabo en *T. brucei*, actúa protegiendo la membrana de las mitocondrias y de los lisosomas de la peroxidación de lípidos inducida por el hierro y está relacionado con la detección de hidroperóxidos y la regulación de las cascadas de señalización redox, según se ha visto en otros organismos (10).

Con respecto al desarrollo de fármacos que actúen sobre estas enzimas, se han identificado disruptores de la estructura activa de chaperona de la 2-Cys-PRX (clave en su fase en el hospedador mamífero) a través de la interacción de las Cys<sup>83</sup> y Cys<sup>173</sup> de la enzima (15). El problema es, que al estar muy conservadas, es difícil encontrar selectividad. También se han diseñado inhibidores de su actividad peroxidasa. La ns-GPX citosólica promete ser una buena diana gracias a su esencialidad, diferencia estructural con las glutatión-peroxididasas de los mamíferos y a sus buenas características para el desarrollo de fármacos al presentar sitios potenciales de inhibición, según se ha visto en algunas especies de tripanosoma. En ambos casos queda mucho por investigar sobre ellas todavía. (10)

### ***Enzimas del metabolismo de los folatos***

Los folatos son cofactores esenciales en las reacciones que precisan de una metilación. Esto es importante para la biosíntesis de ADN y ARN, así como de algunos aminoácidos. Los kinetoplastidos son autótrofos para los folatos como para las pteridinas no conjugadas. Aunque no son siempre esenciales, la inhibición de varias enzimas del metabolismo de los folatos produce una disminución de la virulencia en modelos animales (16)(17).

Entre las enzimas que participan en el metabolismo de los folatos tenemos a la dihidrofolato reductasa (DHFR) que cataliza la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato; y la timidilato sintasa (TS), que convierte el dUMP en dTMP (16). Juntas conforman una enzima bifuncional, un homodímero, situándose la DHFR en dos dominios en el extremo amino terminal, separadas por la TS en el carboxiterminal en la zona central (18). Se ha visto una extensión de 22 aminoácidos en el extremo N-terminal, la cual se sitúa cerca del sitio activo de la TS. Se llevaron a cabo estudios mutacionales, suprimiendo esta extensión para ver si tenía efecto sobre la actividad catalítica de la DHFR. El resultado fue un aumento de 3 veces la capacidad catalítica de la DHFR, por lo que esta extensión en el dominio N-terminal tiene un papel autoinhibitorio. Asimismo, al igual que en otros parásitos que cuentan con una DHFR-TS bifuncional, se identificó la posible presencia en *L. major* de un canal entre la TS y la DHFR que permitiese el paso de dihidrofolato para que sea reducido por la DHFR (19).

En un estudio realizado para detectar posibles inhibidores no dirigidos al centro activo de la DHFR-TS en *L. major*, se observó que la eosina b se unía al canal que enlaza los dominios de ambas enzimas (Ilustración 5). Es probable que el inhibidor produzca un cambio en la conformación de proteínas que lleve a la una disminución en la actividad de un centro activo o que se altere la comunicación dominio-dominio. La interacción se produciría en la Arg-283 del dominio de la TS, pues se ha visto que su supresión disminuye la capacidad inhibitoria de la eosina b, y de Glu-151 del dominio de la DHFR. También se ha comprobado que la inhibición no es dependiente de la concentración de enzima y que afecta más a la TS. La eosina b tiene una IC<sub>50</sub> de 100μM, sin embargo, su capacidad inhibitoria en cultivos celulares es bastante baja, debido posiblemente a la estabilidad o a la absorción (20).

El estudio evaluó la capacidad inhibitoria de análogos de la eosina b como son la fenoftaleína y la fluoresceína. La fluoresceína no cuenta con los grupo nitro ni halógenos y su potencia de inhibición es 8 veces menor. En un principio se pensó que el grupo hidroxilo de la eosina b constituían los puntos de interacción más importantes, pero al compararlos con la fluoresceína, se ha planteado que, aunque influyen, los bromos de las posiciones 4 y 5 y los grupos nitro de las posiciones 2 y 7 deben tener un papel importante al aumentar la hidrofobicidad de la eosina. El bromo en la posición 5, al estar cerca de un bolsillo hidrofóbico, es candidato a sufrir modificaciones. En próximos estudios se podrían llevar a



sitios activos, sino a la zona entre ambos, bloqueando el canal electrostático del enzima. Aunque se une preferentemente a la DHFR-TS del parásito, también se ha visto que interacciona con el centro activo de la DHFR y TS humanas debido a las diferencias en su secuencia (21).

#### Otras enzimas del metabolismo de los folatos

El 5,10-metilentetrahidrofolato es el producto de la reacción llevada a cabo tanto por la serina hidroximetil transferasa (SHMT) como por el complejo de fragmentación de glicina (glycine cleavage complex, GCC) a partir del tetrahidrofolato. Es un metabolito importante porque actúa como cofactor de la TS para la síntesis de timidilato a partir de dUMP. Además también es el sustrato de la metilentrtahidrofolato reductasa (MTHFR), cuyo producto actuará como cofactor en la síntesis de metionina, y de la formiltetrahidrofolato ligasa (FTL) o de la metilentetrahidrofolato deshidrogenasa-metilentetrahidrofolato ciclasa (DHCH), que produce 10-CHO-tetrahidrofolato, cofactor de la reacción de metilación del Met-tRNA<sup>MET</sup> para la síntesis de proteínas. Estos procesos son importantes para el crecimiento, por lo que una inhibición a nivel de alguna de estas 5 enzimas alteraría la homeostasis del parásito (17).

Existe una gran familia de transportadores, los transportadores de folatos-biopterina (FBT) cuyos genes están repartidos en varios cromosomas. Los FT permiten el paso de folatos y metotrexato, pero los BT, solo permiten el paso de biopterina del medio. Según varios estudios, estos parásitos no pueden sintetizar estos compuestos *de novo* por lo que su captación del medio es crucial. Asimismo, aunque esta familia se haya denominada FBT, no solo transportan pteridinas, pues se ha visto que el transportador de la S-adenosilmetionina pertenece a la misma (17).

Finalmente, se ha descubierto una proteína mitocondrial conocida como YGFZ, la cual, si se suprime, produce la disminución en la expresión de un pequeño grupo de proteínas de hierro-azufre. La disminución en la expresión de estas proteínas conlleva un aumento en la sensibilidad al estrés oxidativo. No se sabe qué relación tienen los folatos con estos grupos de proteínas de hierro-azufre, lo que demuestra que todavía queda mucho por conocer sobre cómo funciona el metabolismo de estos kinetoplástidos y que con el tiempo se irán descubriendo nuevas proteínas y funciones que éstas desempeñan en estos organismos, abriendo nuevas rutas para el diseño de nuevos fármacos (17).

#### ***Metabolismo de las purinas***

Las pirimidinas, de las que hemos hablado en la ruta de síntesis del timidilato, y las purinas son vitales para la correcta realización de las funciones vitales: síntesis de ADN/ARN, ATP, de cAMP/cGMP, de precursores de las formas activadas de lípidos y carbohidratos y de cofactores de reacciones metabólicas (los derivados de vitaminas)(22). Los kinetoplástidos no poseen una ruta de síntesis de purinas *de novo*, por lo que deben obtenerlas del hospedador. Esto lo hacen a través de varios transportadores, que podrían ser una diana hacia las que dirigir fármacos, aunque esta estrategia plantearía dificultades debido a su gran variedad (18).

En un estudio se investigó cómo afecta la supresión de la GMPR, la IMPDH o ambas en la supervivencia de cepas de *Leishmania* en distintos medios deficientes en purinas o con solo xantina o hipoxantina. Se observó que la ruta de síntesis del AMP es la más importante. En general se ve un aumento en la expresión de enzimas como la HGPRT y XPRT, el transportador LdNT2 y algunas oxidoreductasas, al inducirse cambios a nivel del mRNA.

Durante el periodo de deficiencia de purinas se produjo una interrupción de la división celular, quedándose latente en la fase G1/G0, lo que les permitió sobrevivir durante 3 meses. Esto se dio de esta manera en todos los casos, a excepción de las cepas incubada con hipoxantina, en las que se ve que hay una distribución entre las otras fases como la S y la G2/M, por lo que se estaría dando la síntesis de ADN. Se cree que la incapacidad de mantenerse en la fase G0/G1 podría dificultar la supervivencia de esta cepa. También, se comprobó que se producía un acúmulo de L-prolina, un metabolito relacionado con la respuesta a estrés, en el caso en la producción de adenilato está comprometida (23).

Debido a que la *Leishmania* no posee o no se conocen mecanismos como los receptores de tirosin-quinasa ni de proteína G, así como la ruta de señalización clásica, se cree que la regulación metabólica viene dada por la concentración de purinas intracelular, no por las concentraciones extracelulares. En concreto, es la alteración en los niveles de adenilato los que desencadenarían la respuesta adaptativa, siendo la protein-quinasa activada por AMP (AMPK) la posible responsable del control de la regulación. Todavía se deben hacer más estudios para determinar con más exactitud cómo funciona y se regula el metabolismo de las purinas, los cuales nos ayudarán a identificar las mejores dianas para el diseño de fármacos. (23). En la actualidad se utiliza el alopurinol, un análogo estructural de la xantina, que es fosforilado por la HGPRT e incorporado luego al ADN/ARN, lo que lleva a la muerte del parásito (18).

### Quinasas

Las quinasas son un tipo de enzima que catalizan la transformación de moléculas mediante la adición de un grupo fosfato. Cumplen funciones reguladoras en distintos procesos como el ciclo celular y la diferenciación, la transcripción y la señalización, entre otras (24). En *Leishmania* existen dos serina-treonina-quinasas que pertenecen a la familia de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK): la CRK1 y la CRK3. La CRK1 solo es activa en promastigotes. Por otro lado, hay evidencia de que la CRK3 es un homólogo funcional de la CDK1 (25). Actúa formando un enlace con la p12cks1 de la histona H1 tanto en promastigotes como en amastigotes en *L. mexicana* y, además, interacciona con la ciclina mitótica CYC6 y la ciclina CYC2, relacionada con el avance a través de la fase G1. Por lo tanto, este enzima controla el paso a la mitosis (fases G2/M) e interviene en la regulación de la G1 (24) (25).

Los inhibidores de protein-quinasas suelen ser inhibidores competitivos de ATP, inhibidores específicos del sustrato, inhibidores irreversibles o inhibidores de la activación. La mayoría de estos son inhibidores competitivos de ATP, aunque los mejores son los que previenen la actividad al producir cambios en la conformación (24). Un inhibidor de la CRK-3 es el flavopiridol, una flavona semisintética (Ilustración 7). Actúa de forma reversible a través de una inhibición competitiva de ATP. Se ha visto inhibe el crecimiento de promastigotes *in vitro*, pero resulta bastante tóxico (25).

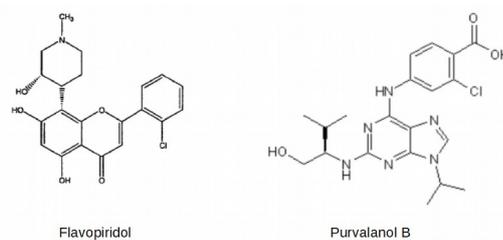


Ilustración 7: Inhibidores de protein-quinasa.

Por otro lado tenemos a las MAP quinasas (quinasas activadas por mitógenos) son enzimas que regulan la diferenciación y la proliferación celular al transmitir señales producidas por estímulos externos, que conllevan un cambio a nivel de la transcripción. Se han caracterizado tres de ellas en *L. mexicana*: LmMPK, LmMPK9 y LmxMKK (ésta última es una quinasa activadora de MAPK), pero solo LmMPK tiene potencial como diana. Se ha visto que impide la proliferación de los amastigotes en la vacuola parasitófora e impide el establecimiento de la infección. Por otro lado, tenemos la TbECK1 (*T. brucei* ERK-like, CDK-like kinase), una quinasa que es similar tanto a una MAPK como a una CDK y puede que tenga un papel en el ciclo celular. Posee una extensión C-terminal inusual que actúa como un regulador negativo del enzima, cuya delección conlleva una disminución en el crecimiento y aberraciones en el kinetoplasto. Asimismo, otra quinasa que tiene un interés potencial es la CK1 (quinasa de caseína 1). Se ha visto que difiere estructuralmente con las de los mamíferos gracias a estudios llevados a cabo con el purvalanol, un inhibidor de CDK1 que también interacciona con la CK1 del parásito, pero no la del mamífero (24).

Otra familia de quinasas es la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), implicada en la respuesta celular ante el estrés. Dentro de ella tenemos las serin-treonina quinasas TOR (Target of rapamycin) relacionada con el metabolismo, crecimiento celular y proliferación. En *Leishmania major* se identificaron dos que son esenciales para la supervivencia de los promastigotes: la TOR1 y la TOR2, las cuales comparten una identidad de secuencia con la TOR de los mamíferos de entorno a un 40%, pero una alta similitud estructural. En un estudio llevado a cabo se ha visto que tres compuestos que actúan como inhibidores de mTOR-PI3K: NVP-BGT226, Torin-2 y dactolisib, tienen una buena potencia leishmanicida (Ilustración 8). El primero fue el que mostró mayor actividad, tanto *in vitro* (contra promastigotes y amastigotes intracelulares) como *in vivo* (en ratones BALB y hamsters) contra *L. donovani*. Aunque en un principio se vio que era más potente que la miltefosina, en el estudio *in vivo* los resultados concluyeron que ésta última tenía mayor capacidad leishmanicida (54% de inhibición frente a 87%). Esto se puede deber a que cuando se hizo el estudio de toxicidad, el cual concluyó que no eran tóxicos en los 5 días de tratamiento, se basaron en la bibliografía para determinar las dosis y, en base a eso, se hizo el ensayo *in vivo*. La dosis utilizada del NVP-BGT226 era de 5 mg/kg frente a los 30 mg/kg de la miltefosina. Por lo que se deben hacer más estudios, tanto de toxicidad como de eficacia y desarrollar compuestos más selectivos de la TOR del parásito (26).

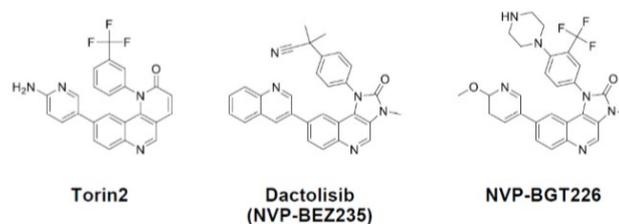


Ilustración 8: Inhibidores de TOR-PI3K. (26)

Por otro lado, tenemos a la GSK3 (quinasa de la glucógeno sintasa). Se trata de una serin-treonina quinasa, una familia de proteínas bastante conservada con homólogos en mamíferos. Los tripanosomátidos tienen 2 ortólogos, uno largo y otro corto. El ortólogo corto de GSK3 posee una secuencia similar a la GSK-3 $\beta$  corta humana (hsGSK3). Desempeña funciones como la regulación del metabolismo del glucógeno y energético, y se la ha relacionado con la transcripción, la proliferación celular, la señalización, el desarrollo embrionario, la regulación del ciclo celular y la muerte (27) (28). El enzima tiene dos dominios conectados por una región bisagra, donde se encuentran el sitio de unión de ATP y los residuos del bucle de

activación. En la parte superior del centro activo se encuentra una zona rica en glicinas. Los inhibidores de la GSK3 en tripanosomátidos compiten con el ATP para unirse a ésta, por lo que vamos a describir mejor el sitio de unión al ATP. Posee una zona extensa para la unión de la ribosa y otra para el trifosfato y el magnesio (II). Además, junto a la zona bisagra se encuentra el sitio de unión de la adenina y, junto a los nitrógenos N6 y N3, hay un bolsillo hidrofóbico cuyo tamaño está controlado por un residuo “gatekeeper”. Se ha visto que existen 3 diferencias en aminoácidos entre los sitios de unión de ATP de la GSK3 corta de *L. major* (LmajGSK3 corta) y la hsGSK3. En la zona rica en glicinas sobre el centro activo en LmGSK3 corta hay una alanina, mientras que en hsGSK3 es una leucina. Luego, en la zona del “gatekeeper” en *L. major* hay una metionina y en humanos ácido glutámico. Finalmente, hay un ácido aspártico en la posición 105 en la LmGSK3 corta mientras que en la hsGSK3 se trata de un ácido glutámico en la 137. Esto hace que en la ésta última pueda crear un puente salino con una arginina cercana, pero el Asp de la LmGSK3 corta no puede llegar y forma un enlace de hidrógeno con el carboxilo de una prolina, lo que reduce el tamaño del bolsillo (27).

Varios estudios muestran que la inhibición de la HsGK3 $\beta$  está relacionada con una actividad antiinflamatoria, por lo que, sumado a su capacidad antiparasitaria, los inhibidores de este enzima podrían resultar beneficiosos para el tratamiento de esta patología (27). Algunos compuestos que han demostrado cierta capacidad inhibitoria de la LmGSK3 son el inhibidor CDK1/2 III y el GW8510, actuando como inhibidores competitivos del ATP. Estos compuestos interaccionarían con el sitio de unión del ATP y mediante enlace de hidrógeno con residuos conservados en la zona bisagra. Sin embargo la selectividad de estos compuestos es baja ya que interaccionan con otras protein-quinasas (27).

En otro estudio se han diseñado y sintetizado una serie de compuestos inhibidores de la GSK3 humana, que luego se probaron en la GSK3 de *L. donovani*. Dentro de estos se encuentran tiazolinadionas (TZD), halometilcetonas (HMK), quinolinas, 5-imino-1,2,4-tiadiazoles (ITDZs) y derivados de maleimida. Las TZDs actúan como inhibidores que se unen covalentemente a través de un puente disulfuro a la Cys-169, residuo conservado que se encuentra a la entrada del sitio de unión del sustrato. Las HMKs también inhiben a la LdGSK3 por unión covalente a la Cys-169. Tanto las TZDs como las HMKs mostraron mayor actividad contra los amastigotes que contra los promastigotes. Las ITDs se unen al bolsillo del sustrato de la LdGSK3, pero no alcanza concentraciones dentro del parásito que permitan su inhibición. Los derivados de maleimida no son capaces de inhibir al enzima, al no poder interaccionar correctamente con el sitio de unión del ATP pero, uno de ellos, al tener una cola con una halometilcetona, sí la inhibe. La quinolina no es capaz de ejercer su actividad como inhibidor alostérico debido a la mutación de arginina a prolina que comentamos anteriormente, la cual modifica la carga eléctrica del bolsillo y la conformación, al ser la prolina un aminoácido neutro y rígido (28).

Otro grupo de compuestos que se discuten en este estudio son los benzoimidazoles, las N-fenilpirimidina-2-aminas y un oxadiazol. Se ha visto que para que sean activas las N-fenilpririmidinas-2-aminas deben tener las posiciones 5 y 6 y el grupo amino sin sustituyentes y un sustituyente aromático en posición 3. En cuanto a los benzoimidazoles, el sustituyente 5-fenilpiridin-2-amino está relacionado con la actividad inhibitoria de la GSK3. Todos estos compuestos son poco selectivos, por lo que la mejora de ésta será una tarea en el desarrollo de nuevos compuestos (28).

## ***Metabolismo energético***

*Leishmania*, al igual que los mamíferos, necesita de glucosa y otros azúcares como fuente de energía a través de la producción de ATP derivado de su degradación, ya sea de forma aeróbica o anaeróbica, ácidos grasos y aminoácidos. La captación de estos compuestos no solo tienen un fin energético, sino estructural y de biosíntesis. Asimismo, se relaciona el paso de promastigote a amastigote con una disminución del metabolismo, en el que desciende la absorción de glucosa y aminoácidos y aumenta la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Una vía importante es la de las pentosas fosfato, ya que producen el NADPH necesario en el metabolismo redox del parásito y ribulosa 5-fosfato. Además, se ha visto que estos parásitos producen UDP-galactofuranosa, que resulta inmunogénico (29).

Entre las enzimas que son potencialmente buenas dianas tenemos la fructosa-bisfosfatasa, la piruvato quinasa y la fosfoglicerato mutasa independiente de cofactor, una variante de esta enzima presente en el parásito. Todas estas proteínas difieren estructuralmente de las enzimas correspondientes en los mamíferos, por lo que se podrían diseñar inhibidores más selectivos. Estas no son las únicas enzimas para las que se han desarrollado inhibidores o se han tenido en cuenta para ello. Entre otras tenemos la hexosa quinasa, la aldolasa y la gliceraldehído-3-fosfato, glucosa-6-fosfato y 6-fosfogluconato deshidrogenasas (29).

*Leishmania*, al contrario que los mamíferos, almacena su fuente de hidratos de carbono en forma de manógeno, formado por cadenas de oligosacáridos de  $\beta$ -1,2-manosas y que constituye el 80-90% de los hidratos de carbonos celulares. Se ha visto que el manógeno está implicado tanto en la virulencia como en el establecimiento de la infección y supervivencia en el fagolisosoma. En su formación y degradación están implicadas las MTP (1-7) que son manosil-transferasas y fosforilasas, que no existen en los mamíferos, por lo que también son una diana prometedoras (29)(30). Un estudio en el que se llevó a cabo el cribado de varios GMP-triazoles dio como resultado que el compuesto T47 inhibía a la  $\beta$ -1,2-manosiltransferasa. Aunque no es probable que sea útil como agente terapéutico, podría ser un punto de comienzo para la optimización estructural de estos compuestos (31).

## ***Proteasas***

Las proteasas son enzimas que se encargan catalizar la hidrólisis enlaces peptídicos. Podemos distinguir distintos tipos de proteasas. En primer lugar, tenemos las cisteína-proteasas (CPs). Las mejor caracterizadas son la CPA, CPB (ambas L-catepsinas) y CPC (B-catepsina), las cuales poseen estructuras distintas, por lo que difieren en su mecanismo de acción y en cómo se une el sustrato a ellas. Mientras que en la L-catepsina el sustrato se une al sitio de unión y se lleva a cabo la actividad endopeptidasa, la B-catepsina se ve condicionada por el pH. Si el pH es bajo, el canal del sitio de unión se cierra parcialmente y se da actividad carboxipeptidasa; si es alto, el bucle que bloqueaba el canal se desplaza y se produce la actividad endopeptidasa (32).

Las CPs son responsables de la interacción con el hospedador y están relacionadas con la capacidad de infectividad y la virulencia. Además, la CPB regula negativamente la respuesta Th1. Además, se sabe que estas enzimas son esenciales para la supervivencia del parásito. Pese a ello, no existen fármacos aprobados que inhiban esta diana (32).

Un compuesto que ha dado muy buenos resultados en *T. cruzi* es la vinil-sulfona K11777 (Ilustración 9), la cual es un aceptor de Michael para la Cys-25 del centro activo, produciéndose una inhibición irreversible. Además, el resto del compuesto interacciona con el sitio activo a través de enlaces de hidrógeno. El residuo de fenilalanina del compuesto es crucial para la selectividad. Éste interacciona con un Glu por medio de un puente salino. Otro compuesto, el WRR-483, análogo estructural del K11777, que varía en que tiene un residuo de arginina en vez de uno de fenilalanina, también ha demostrado actividad inhibitoria (35).

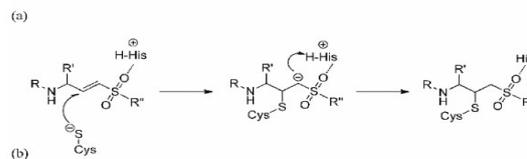
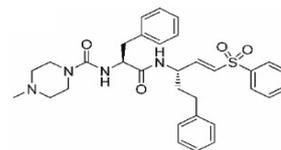


Ilustración 9: Estructura del K11777 y mecanismo de acción (34)

Otros compuestos que han mostrado actividad frente a CPs son algunas flavonas y derivados modificados de éstas como la agatisflavona, la tetrahydro-robustaflavona o la morelloflavona y análogos. Todos son activos frente a la CPB2.8 de *L. mexicana* (los tres primeros compuestos) y de *L. amazonensis* (en el caso de los análogos de morelloflavona). La agatisflavona y la tetrahydro-robustaflavona son inhibidores parciales no competitivos (7) (18). Por otro lado, tenemos las tiosemicarbazonas (a), las semicarbazonas (b) y los nitrilos (c) (Ilustración 10). Estos compuestos tienen actividad inhibitoria de la CPB2.8 y han demostrado cierta selectividad. Además, los peptidomiméticos derivados de aziridina-2,3-dicarboxilato (d) (Ilustración 10), también han demostrado actividad leishmanicida, inhibiendo la CPB2 de *L. major* y la B-catepsina de *L. mexicana*, sin afectar a las catepsinas de los mamíferos, por lo que optaría a estudios *in vivo* (7) (18).

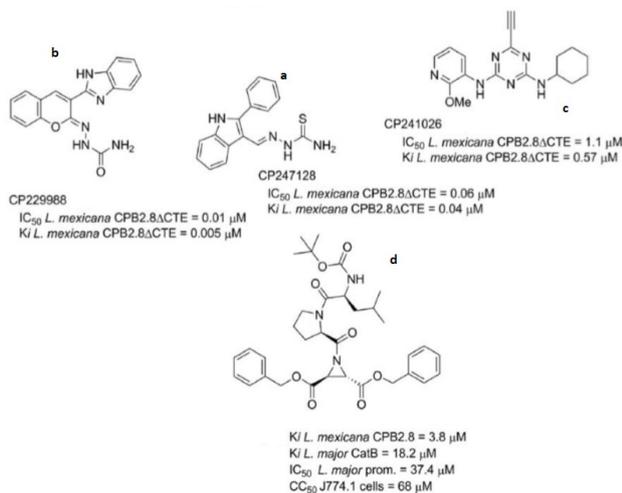


Ilustración 10: Inhibidores de CPB (7)

Otra familia son las proteasas de aspártico, las cuales se ha visto que son inhibidas por antivirales utilizados contra el VIH como el saquinavir y el nelfinavir en todas las especies en las que se ha probado, por lo que pueden ser interesantes en el caso de coinfección *Leishmania*-VIH. También tenemos las serina-proteasas, que son inhibidas por los extractos de *Coccinia grandis*, en los promastigotes de *L. donovani* (7).

Unas peptidasas menos estudiadas pertenecientes a las cisteína-proteasas son la ATG4.1 y la ATG4.2, siendo esta última más relevante. Solo comparten un 19% de identidad con las de los mamíferos y están implicadas en la diferenciación de los promastigotes a amastigotes, por lo que su inhibición disminuye la capacidad infectiva del parásito. La ATG4 es esencial para que la ATG8 pueda formar los autofagosomas y que se puedan degradar los orgánulos y proteínas defectuosas (35).

## 6 Conclusiones

- La leishmaniasis es una NTD, en la que se debe trabajar para conseguir un tratamiento eficaz y seguro. Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años en el descubrimiento de las estructuras y funciones de enzimas esenciales para la supervivencia, la virulencia y la infectividad en *Leishmania* como la TryS, la TryR, DHFR-TS y la CPB, entre otras, todavía queda un largo camino por delante.

- La ATG4, las manosiltransferasas y fosforilasas, la deoxifusina sintasa, la AdoMetDC y la proteína YGFZ son algunos ejemplos de enzimas o proteínas poco estudiadas, pero que podrían ser dianas interesantes para el desarrollo de fármacos.

- Entre los compuestos que se han identificado como leishmanicidas y que prometen ser buenos agentes terapéuticos tenemos el K11777 (inhibidor de CP), NVP-BGT226 (inhibidor de mTOR-PI3K) y la Witaferina A (inhibidor de DHFR-TS y PTR-1). El purvalanol y el flavopiridol, ambos inhibidores de quinasas utilizados en la terapia anticancerígena, podrían ser interesantes; y la eosina b se ha visto que tiene capacidad inhibitoria de la DHFR-TS.

## 7 Bibliografía

1. WHO. Leishmaniasis. [Internet].[Consultado el 5 de abril 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
2. K. Seifert. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. *Open Medicinal Chemistry Journal*. 2011;5: 31-39.
3. M. Gállego y C. Riera. Las leishmaniosis humanas: Leishmaniosis autóctona por *Leishmania infantum* [Internet]. 01-09-2000 [consultado el 5 de abril 2020]. Disponible en <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/leish.pdf>
4. J. Alvar y B. Arana. Leishmaniasis, Impact and Therapeutic Needs. En: L. Rivas y C. Gil (Eds.). *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Royal Society of Chemistry; 2017, 4-23.
5. C.E. Mowbray. Anti-leishmanial Drug Discovery: Past, Present and Future Perspectives. En: L. Rivas y C. Gil (Eds.) *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Royal Society of Chemistry; 2017, 24-36.
6. R. Rajasekaran e Y. P. Chen. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discovery Today*. 2015; 20 (8): 958-968. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.04.006>
7. A. Martínez y C. Gil. Medicinal chemistry strategies to discover new leishmanicidal drugs. En: L. Rivas y C. Gil (Eds.) *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Royal Society of Chemistry; 2017, 153-178.
8. M. A. Phillips. Polyamines in protozoan pathogens. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(48): 18746–18756.

9. E. K. Willert, M. A. Phillips. Regulated Expression of an Essential Allosteric Activator of Polyamine Biosynthesis in African Trypanosomes. *PLoS Pathog.* 2008; 4(10): e1000183. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000183>
10. H. Castro, M. Duarte y A. M. Tomás. The redox metabolism and oxidative stress in *Leishmania* a a crossroads for the lethal effect of drugs. En: L. Rivas y C. Gil (Eds.) *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Royal Society of Chemistry; 2017, 316-347.
11. S. Wyllie, M. L. Cunningham, A.H. Fairlamb . Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(38): 39925-39932. Disponible en: doi:10.1074/jbc.M405635200
12. H. Denton, J. C. McGregor y G. H. Coombs. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem. J.* 2004; 381: 405–412.
13. J. Fernández Trijueque. Caracterización funcional de las tiorredoxinas F y M en *Arabidopsis thaliana*. Tesis doctoral, Universidad de Granada; 2015.
14. F. Fueller *et al.* High Throughput Screening against the Peroxidase Cascade of African Trypanosomes Identifies Antiparasitic Compounds That Inactivate Tryparedoxin. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (12): 8792–8802.
15. Q. Zhao, Y. Ding *et al.* Natural Products Triptolide, celastrol and withaferin A inhibit the chaperone activity of peroxiredoxin I. *Chem. Sci.* 2015; 6 (7): 4124-4130.
16. L. A. Webster *et al.* Development of Chemical Proteomics for the Folateome and Analysis of the Kinetoplastid Folateome. *ACS Infect. Dis.* 2018; 4, (10): 1475–1486. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00097>
17. T. J. Vickers y S. M. Beverley. Folate metabolic pathways in *Leishmania*. *Essays Biochem.* 2011 ; 51: 63–80. Disponible en: doi:10.1042/bse0510063.
18. A. S. Nagle *et al.* Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chem. Rev.* 2014; 114: 11305–11347. Disponible en: [dx.doi.org/10.1021/cr500365f](https://doi.org/10.1021/cr500365f)
19. K. S. Anderson. Understanding the molecular mechanism of substrate channeling and domain communication in protozoal bifunctional TS-DHFR. *Protein Engineering, Design & Selection.* 2017; 30 (3): 255–263. Disponible en: doi: 10.1093/protein/gzx004
20. C. E. Atreya *et al.* A Molecular Docking Strategy Identifies Eosin B as a Non-active Site Inhibitor of Protozoal Bifunctional Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (16): 14092–14100.
21. B. Vadloori *et al.* Homology modelling, molecular docking, and molecular dynamics simulations reveal the inhibition of *Leishmania donovani* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase enzyme by Withaferin-A. *BMC Res Notes.* 2018;11:246. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3354-1>
22. A. Cavalli y M. L. Bolognesi. Neglected Tropical Diseases: Multi-target-Directed ligands in the search for novel lead candidates against *trypanosoma* and *leishmania*. *J. Med. Chem.* 2009; 52( 23): 7339–7359. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jm9004835>
23. J. L. Martin *et al.* A role for adenine nucleotides in the sensing mechanism to purine starvation in *Leishmania Donovanii*. *Mol. Microbiol.* (2016); 101(2), 299–313.
24. C. Naula *et al.* Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim. Biophys Acta.* 2005; 1754(1-2): 151–159.
25. P. Hassan *et al.* The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001; 113(2):189-98.
26. T. N. Phan *et al.* . In Vitro and in Vivo Activity of mTOR Kinase and PI3K Inhibitors Against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei*. *Molecules* 2020; 25(8) :1980.

27. K. K. Ojo *et al.* Structure Determination of Glycogen Synthase Kinase-3 from *Leishmania major* and Comparative Inhibitor Structure-Activity Relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011; 176(2): 98–108.
28. P. Martínez de Iturrate *et al.* Towards discovery of new leishmanicidal scaffolds able to inhibit *Leishmania* GSK-3. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2020; 35 (1) : 199–210. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1693704>
29. H. Acosta *et al.* Carbon Metabolism as a drug target in leishmania. En: L. Rivas y C. Gil (Eds.) *Drug Discovery for Leishmaniasis*. Royal Society of Chemistry; 2017, 298-315.
30. K. Zhang y St. M. Beverley. Mannogen-ing Central Carbon Metabolism by *Leishmania*. *Trends Parasitol.* 2019; 35 (12): 947-949. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.001>
31. P. Van der Peet *et al.* Discovery of Inhibitors of *Leishmania* b-1,2 Mannosyl transferases Using a Click-Chemistry-Derived Guanosine Monophosphate Library. *PLoS ONE*. 2012; 7(2) :e32642.
32. J. L. Siqueira-Neto *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases* . 2018; 12(8): e0006512. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
33. J. T. Chen *et al.* In Vitro and In Vivo Studies of the Trypanocidal Properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010; 4(9): e825.
34. T. H. Schneider *et al.* Vinyl sulfone building blocks in covalently reversible reactions with thiols. *New Journal of Chemistry*. 2015; 39 (7), 5841-5853.
35. R. A. M. Williams *et al.* Distinct Roles in Autophagy and Importance in Infectivity of the Two ATG4 Cysteine Peptidases of *Leishmania major*. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2013; 288(5) : 3678–3690.