



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA**



**TÍTULO**

**“BUSQUEDA POR DOCKING EN LA TRIOSAFOSFATO  
ISOMERASA DE *Leishmania mexicana* DE MOLÉCULAS LIDER  
PARA LA OBTENCIÓN DE UN NUEVO FARMACO EN EL  
TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS”**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN FARMACIA**

**P R E S E N T A**

**MARTÍN TREJO GARCÍA**

**DIRECTORES**

**DR. ALFREDO TÉLLEZ VALENCIA  
M. en C. JOSÉ RAMÓN MONTEJANO RODRÍGUEZ**

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS**

Por permitirme realizar mi primera meta, la cual es que estoy trabajando y a la par estar presentando mi tesis que refleja esfuerzo y dedicación.

### **A MIS PADRES**

Ma. Luisa y Martín que sin su apoyo y sacrificio nunca hubiese logrado esta meta. Esto es para ustedes y los AMO papis.

### **A MIS PROFESORES**

Dr. Alfredo Téllez, gracias por creer en mí y ayudarme a conseguir este sueño.  
Maestra Georgina Almaguer, Maestro José Ramón Montejano, Maestro Abelardo Camacho Luis, muchas gracias porque sin su perseverancia y dedicación mi sueño nunca estaría completo y mas que profesores son verdaderos AMIGOS, se los agradezco de corazón.

### **A MIS HERMANOS**

Karina y José Juan, gracias por creer en mí y espero ser un apoyo como hermano, así como un ejemplo de profesionalismo. Para tí José, continua con tus sueños que siempre los podrás lograr si te esfuerzas un poco.

### **A MIS TIOS**

Abundia y Tomas que sin su apoyo económico y moral nunca hubiese finalizado mi educación. GRACIAS Y SIEMPRE ESTARE AGRADECIDO CON USTEDES.

### **A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS**

Judith Parra, Lupita Zendejas, Aurora Mayela, Ángeles Monzalvo, Lupita Araceli, Elio López, gracias por todo su apoyo en todo, no solo en cuestión educativa si no en lo emocional. Son una JOYA.

### **A MI AMIGO**

YAYO gracias por brindarme tu amistad y recuerda que siempre contarás con mi apoyo.

### **A MI NOVIA**

Elia gracias por tu apoyo en todo momento, sabes que siempre contarás conmigo. TE AMO

Y por ultimo sin omitir a nadie a todos y cada una de las personas que en algún momento y de alguna forma contribuyeron para lograr mi SUEÑO....

### **MIL GRACIAS**

# ÍNDICE

Página

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Tratamiento de la leishmaniasis.	7
2.2 La triosafosfato isomerasa (TIM) como el blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios.	12
2.3 Estructura de la triosafosfato isomerasa (TIM).	13
2.4 La interfase de enzimas oligoméricas como blanco para el diseño de fármacos.	14
2.5 Simulación del reconocimiento “DOCKING”.	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVO GENERAL	21
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
7. METODOLOGÍA	22
7.1 Moléculas Ensayadas	22
7.2 Reactivos.	22
7.3 Generación de la Librería de moléculas en su conformación de mínima energía.	22

7.4 Realización del Docking.	22
7.5 Selección de las moléculas.	23
7.6 Enzimas.	23
7.7 Preparación del sustrato.	23
7.8 Actividad.	23
7.9 Ensayos de inactivación.	24
8. RESULTADOS	25
8.1 Puentes de hidrógeno entre las moléculas 9 y 10 con respecto a los residuos de ambos monómeros.	28
8.2 Moléculas con una estructura similar, que fueron ensayadas pero que no inactivaron a la LmTIM.	29
9. DISCUSIÓN	33
10. CONCLUSIONES	35
11. PERSPECTIVAS	36
12. BIBLIOGRAFÍA	37

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de Leishmania. Tomado de la página de Organización Mundial de la Salud.	6
<b>Figura 2.</b> Estructura Química de <b>(a)</b> Estibogluconato de Sodio y <b>(b)</b> Antimoniato de Meglumina.	8
<b>Figura 3.</b> Estructura de la Pentamidina.	8
<b>Figura 4.</b> Estructura de la Anfotericina B.	9
<b>Figura 5.</b> Estructura Química de la <b>(a)</b> Azitromicina y <b>(b)</b> Miltefosina.	9
<b>Figura 6.</b> Organización de las enzimas glucolíticas en el tripanosoma.	11
<b>Figura 7.</b> Estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa de Leishmania mexicana.	13
<b>Figura 8.</b> Interfase de la LmTIM, <b>A)</b> Vista lateral y <b>B)</b> Vista Superior de la interfase de la LmTIM.	25
<b>Figura 9.</b> Acoplamiento de las moléculas 9 (A) y 10 (B), sobre la interfase. La enzima se muestra con su superficie de Conolly y los compuestos en CPK.	27
<b>Figura 10.</b> Puentes de hidrógeno formados entre el compuesto 9 (A) y el compuesto 10 (B) con la LmTIM.	28
<b>Figura 11.</b> Vista del acomodo en la interfase de los compuestos 11 y 12 que no presentan puentes de hidrógeno.	31
<b>Figura 12.</b> Representación de la interfase y formación de puentes de hidrógeno de las moléculas 14, 15 y 16.	32

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Moléculas seleccionadas por docking para la inactivación de la LmTIM.	<b>26</b>
<b>Tabla 2.</b> Residuos del Monómero A y Monómero B de la LmTIM a menos de 5 Å de los compuestos 9 y 10.	<b>27</b>
<b>Tabla 3.</b> Residuos a menos de 5 angstrom de la molécula 11 a la 16.	<b>29</b>

## ABREVIATURAS

<b>A°</b>	angstrom
<b>AChE</b>	acetil-colinesterasa
<b>ATP</b>	adenosin trifosfato
<b>αGDH</b>	α-glicerolfosfato deshidrogenasa
<b>DHAP</b>	dihidroxiacetona fosfato
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetracético
<b>GAP</b>	gliceraldehido-3-fosfato
<b>LC</b>	Leishmaniasis cutánea
<b>LCD</b>	Leishmaniasis cutánea difusa
<b>Lm</b>	<i>Leishmania mexicana</i>
<b>LmTIM</b>	triosafosfato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i>
<b>LMC</b>	Leishmaniasis mucocutánea
<b>LV</b>	Leishmaniasis visceral
<b>NADH</b>	Nicotinadenin dinucleótido reducido
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinadenin dinucleótido oxidado
<b>TIM</b>	triosafosfato isomerasa
<b>RAM</b>	Reacción adversa de los medicamentos

---

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad endémica que abarca zonas áridas, tropicales y subtropicales. La Organización Mundial de la Salud (OMS), indica que alrededor de 12 millones de personas están infectadas de leishmaniasis en el mundo, con una mortalidad anual de 50, 000 casos. Esta enfermedad es producida por protozoarios del género *Leishmania*, parásitos pertenecientes a la familia de los tripanosomátidos, y transmitidos por mosquitos del género *Lutzomya* y *Phlebotomus*, (pequeños dípteros llamados papalotillas). El tratamiento de la Leishmaniasis ha sido problemático debido a que los medicamentos disponibles exigen administración parenteral repetida, no son eficaces en todas las etapas de la infección además depende de la especie del parásito y del estado inmunitario del paciente; De igual forma la mayoría se relaciona con reacciones adversas graves, costo elevado y surgimiento de cepas del parásito resistentes al medicamento. Por tal motivo es necesaria la generación de nuevos fármacos. Una opción para la búsqueda de inhibidores de una enzima clave en el metabolismo del parásito, los cuales potencialmente puedan servir como guías para el diseño de un nuevo fármaco. En este sentido, una característica importante del metabolismo de los tripanosomátidos es su enorme dependencia de la glucólisis para la producción de ATP, lo anterior hace de las enzimas de esta ruta, blancos atractivos para el diseño de fármacos. Dentro de las enzimas glucolíticas se ha propuesto a la triosafosfato isomerasa (TIM) como blanco para el diseño de fármacos contra los tripanosomátidos. La TIM es una enzima homodimérica que cataliza la interconversión entre gliceraldehido-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Dentro de las diversas metodologías utilizadas para el descubrimiento de inhibidores de enzimas se encuentran la técnica computacional de simulación del reconocimiento o "DOCKING". En el presente trabajo, se utilizó esta metodología, teniendo como blanco la TIM de *L. mexicana* (LmTIM). Debido a que la enzima solo es activa en su forma dimérica se tomó la interfase entre los dímeros de la misma, como sitio para simular la unión de una base de datos de moléculas pequeñas que consta de alrededor de 50,000 compuestos. Se seleccionaron las 200 moléculas con mayor afinidad por la enzima de acuerdo al docking y se determinó su capacidad de inhibición *in vitro* en la LmTIM a una



---

concentración de 200  $\mu\text{M}$ . De las moléculas ensayadas dos inactivaron a la enzima en un 35% (compuestos 9 y 10). Después de un análisis estructural se concluyó que el núcleo de los tres anillos unidos más el heterociclo de seis átomos de carbono y el anillo bencénico que forman parte de la estructura de estas moléculas, son la base para la búsqueda o síntesis de nuevas moléculas con diferentes sustituyentes que puedan tener mayor capacidad de inactivación y puedan servir como líderes en la obtención de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad de amplia distribución geográfica en el mundo, que abarca zonas áridas, tropicales y subtropicales. Su incidencia ha aumentado en los últimos años, hasta en un 500%. Cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que alrededor de 12 millones de personas están infectadas de leishmaniasis en el mundo, con una mortalidad anual de 50, 000 casos. Un ejemplo muy singular es el número de casos reportados en Afganistán por año, mayor a 100 000.<sup>(1, 2)</sup>

Esta enfermedad es producida por protozoarios del género *Leishmania* y transmitida por mosquitos del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, (pequeños dípteros llamados papalotillas). Existen 20 especies diversas de *Leishmania*, de las cuales cuatro parasitan al hombre: *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. tropica*.<sup>(3)</sup>

Las infecciones por *Leishmania* suelen presentarse en tres síndromes principales que dependen de la especie en juego y de la respuesta inmunitaria del huésped: (1) Leishmaniasis Cutánea (LC), que según algunos estudios, es la forma mas común a nivel mundial (50-75%), (2) Leishmaniasis Mucocutánea (LM); y (3) Leishmaniasis Visceral (LV), que constituye la forma de afectación sistémica de la infección.<sup>(2,4)</sup>

En México, la principal manifestación clínica es la Leishmaniasis cutánea, cuyo agente etiológico es *Leishmania mexicana* y varias subespecies. Su distribución abarca desde el sureste de México, Veracruz, San Luís Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Tabasco, Campeche y Quintana Roo. Datos estadísticos realizados de 1995 al 2000, muestran por ejemplo que en Tabasco en 1995 no se presentó ningún caso, mientras que en el 2000, se presentaron 103 casos; en Quintana Roo, 114 casos en 1995 y para el 2000 el número de casos se incrementaron a 356.<sup>(4)</sup> No obstante tras la creciente infección, la legislación no la considera como trastorno de Notificación Obligatoria, por lo cual el registro nacional es subestimado, pero se estima que anualmente se presentan 400 nuevos casos.

---

El tratamiento de la Leishmaniasis es problemático debido a que los medicamentos disponibles exigen administración parenteral repetida, no son efectivos en todas las etapas de la infección, además de que la eficacia del medicamento depende de la especie del parásito y del estado del sistema inmunitario. De igual forma la mayoría se relaciona con reacciones adversas graves, con un costo elevado y el surgimiento de cepas resistentes al medicamento ha llevado a una búsqueda constante de nuevos agentes terapéuticos.<sup>(5)</sup>

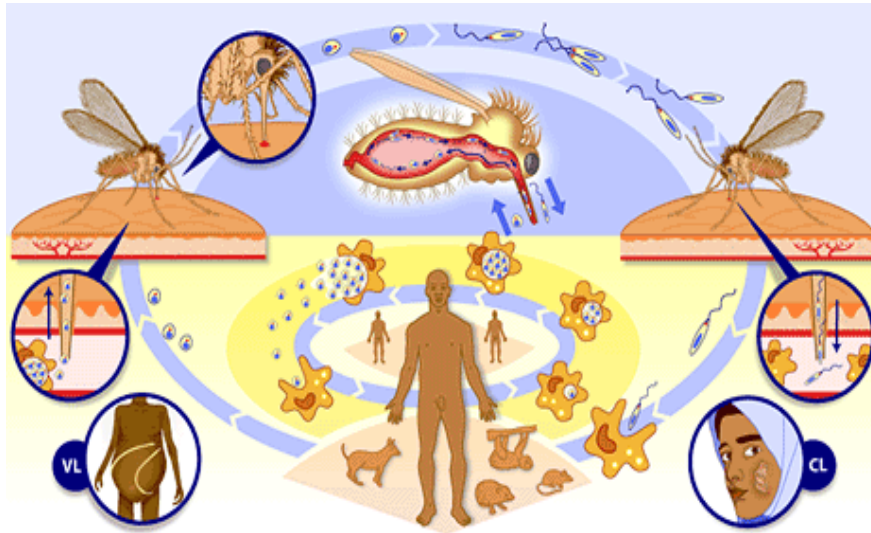
---

## 2. ANTECEDENTES

*Leishmania* es un protozooario hemoflagelado intracelular obligado, perteneciente a la familia de los Tripanosomatidos que infecta macrófagos de piel (mediante diversos mecanismos la leishmania inhibe aproximadamente el 40 % de los genes del macrófago, y el efecto es una limitación acentuada de éste en sus funciones como célula efectora; así como su capacidad de presentación de antígenos) y vísceras del hombre y diversos animales mamíferos.<sup>(5)</sup>

Este parásito tiene un ciclo de vida que incluye dos etapas morfológicas; promastigote y amastigote. Los promastigotes son depositados en la piel del huésped a través de la secreción salival, cuando una mosca de arena( del género *Lutzomia* ò *Phlebotomus*), llamado papalotilla, chupa sangre de un huésped infectado, los promastigotes metacíclicos son rápidamente fagocitados por los macrófagos o las células de Langerhans en la piel; los promastigotes fagocitados son envueltos en un fagolisosoma en la célula huésped y se transforman en amastigotes, los cuales ajustan las bajas temperaturas y el bajo pH ambiental, dentro del fagolisosoma. La replicación por fisión binaria comienza, hasta que se rompen las células infectadas y se liberan los amastigotes que son fagocitados por otros macrófagos en la piel u otros órganos viscerales donde continúan dividiéndose.

Cuando la mosca de arena hembra, se alimenta de sangre de un huésped ya infectado, ingiere amastigotes, los cuales son liberados dentro del intestino medio del insecto. Durante los siguientes días, el amastigote se convierte en promastigote y se replica por fisión binaria, sigue transformándose sin dividirse; el amastigote se encuentra en la etapa metacíclica altamente infecciosa, en la cual se mueve a la faringe y a la probóscide del insecto vector, donde los transmite durante su siguiente ingesta de sangre (Figura 1).<sup>(2)</sup>



**Figura 1.** Ciclo de vida de la Leishmania. Tomado de la pagina de Organización Mundial de la Salud ([www.who.org](http://www.who.org)).

Existen más de 20 especies diferentes del genero *Leishmania* que infectan al hombre; éstas pueden generar tres patrones clínicos que se clasifican como Leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral, según sea la especie lesiva. <sup>(5)</sup> La Leishmaniasis cutánea es producida por la *L. mexicana*, la cual se caracteriza por presentar úlceras eritematosas con bordes indurados, fondo plano e indoloras y por lo regular se presentan lesiones fuera del pabellón auricular con curación espontánea en 6 meses, de forma crónica y con destrucción de cartílago y deformación del pabellón. Mientras que la Leishmaniasis mucocutánea es provocada por *L. brasiliensis*, se presenta con úlceras en contorno redondeado, úlcera exudativa, dolor, engrosamiento de la mucosa, necrosis y cuando la infección esta avanzada, su ultima alternativa es la cirugía y la Leishmaniasis visceral o Kala-azar es causada por la *L. donovani*, se caracteriza por esplenomegalia y linfadenopatía, en ocasiones con dimensiones impresionantes.

De acuerdo a los datos brindados por la OMS, la leishmaniasis es un padecimiento endémico que afecta a 88 países de los 4 continentes (ocupa el 2do. lugar a nivel mundial de las enfermedades tropicales), destacando que más del 90 % de los casos de LC reportados ocurren en Irán, Afganistán, Siria, Arabia Saudita y Perú. Y más del 90% de casos de LV reportados, pertenecen a Brasil, Sudan e India.<sup>(2, 5)</sup>

---

Además en el año 2000 se reconoció una epidemia de leishmaniasis cutánea en Kabul, Afganistán, en la cual se estima que más de 200 000 personas fueron infectadas.<sup>(2)</sup>

En México, se presenta un tipo particular de LC llamada “úlceras de los chicleros” que es provocada por la *Leishmania mexicana*, ya que tradicionalmente afecta a hombres que laboran en regiones selváticas en las cosechas de chicle. El estado de Tabasco es uno de los más afectados del país, las regiones más endémicas muestran una relación con el cultivo del cacao. El desecho de cáscaras de cacao, ricas en nutrientes orgánicos, favorecen el desarrollo de larvas de *Lutzomya*.<sup>(4, 5,6)</sup>

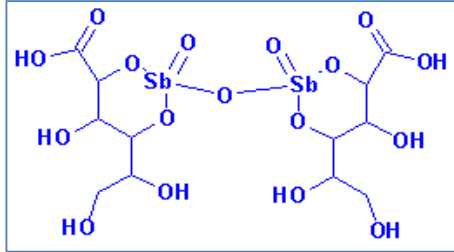
## 2.1 Tratamiento de la leishmaniasis.

En el tratamiento de la leishmaniasis se han desarrollado pocos medicamentos, los fármacos existentes para el tratamiento son los siguientes: antimoniales, pentamidina, amfotericina B, azitromicina, miltefosina, alopurinol, aminosidina / paramomicina, azoles, itraconazol.

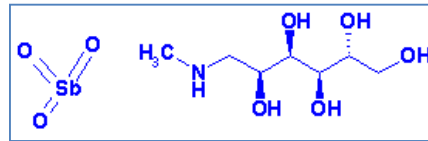
**Antimoniales.** Los antimoniales pentavalentes, Estibogluconato de sodio (**pentosam<sup>R</sup>**) y el Antimoniato de meglumina (**glucantime<sup>R</sup>**), son considerados la primera generación de fármacos antileishmania; los cuales actúan inhibiendo selectivamente a la Fosfofructocinasa con subsecuente bloqueo de la producción de ATP (Figura 2). Estos han sido utilizados para el tratamiento de todas las formas de leishmaniasis, excepto para la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), por los últimos 40 años. La dosis de estibogluconato sódico es de 20 mg/kg/día por vía Intramuscular o Intravenosa, con una dosis máxima de 850mg durante 20 días o hasta 2 semanas después de la eliminación del parásito. Además de que ambos necesitan hospitalización por todo el tiempo que dure el tratamiento debido a su toxicidad. Las reacciones adversas de los medicamentos (RAM) incluyen: mialgia, anorexia, vomito, letargia, daño hepático, cardiaco y renal. Se han observado fallas en el tratamiento con los antimoniales pentavalentes durante la farmacoterapia de la leishmaniasis. Los motivos por los cuales se considera que falló el tratamiento incluyen, desarrollo de resistencia, pobre penetración del fármaco en los sitios de infección, pobre inmunidad del huésped, falta del entendimiento de la

farmacocinética y quizás lo más importante, diferencia en la sensibilidad a los fármacos dependiendo de la especie y cepas de *Leishmania*.<sup>(2,7)</sup>

a)



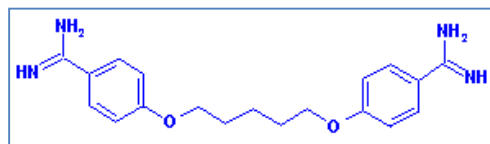
b)



**Figura 2.** Estructura Química de (a) Estibogluconato de Sodio y (b) Antimoniato de Meglumina.

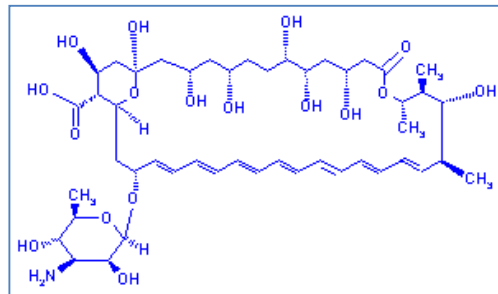
**Pentamidina.** Interfiere con el RNA y DNA, por inhibición de fosforilación oxidativa y/o interfiere con la incorporación de nucleótidos y ácidos nucleicos dentro del RNA y DNA del protozooario; se utiliza para el tratamiento de la LCD y para casos de LV que no responden a los antimoniales (Figura 3).

Además de que se a demostrado a través de la microscopia que el tratamiento para *Leishmania spp.* con este fármaco, desintegra y colapsa la membrana mitocondrial, siendo este, la primera manifestación del tratamiento contra los parásitos. La dosis recomendaba es de 2 a 4 mg/kg/día vía Intramuscular cada 3 a 4 días por 15 dosis. El largo periodo de tratamiento, la baja velocidad de secreción y las RAM's son inconvenientes para el uso de este medicamento.<sup>(2,7)</sup>



**Figura 3.** Estructura de la Pentamidina.

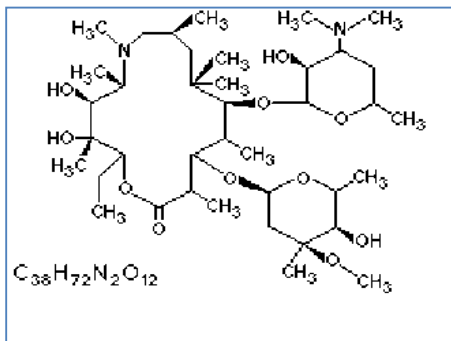
**Amfotericina B.** Es un polieno tóxico, que se une al ergosterol alterando la permeabilidad de la membrana; se utiliza para el tratamiento de casos de LV y de LMC avanzada que no responden a los antimoniales. La dosis recomendada es de 2 a 4 mg/kg/día vía Intramuscular cada 3 a 4 días por 15 dosis. Esta se administra por vía intravenosa y se elimina lentamente; su uso es limitado debido a sus reacciones adversas tales como: trombocitopenia, convulsiones, anorexia y daño renal (Figura 4).<sup>(7)</sup>



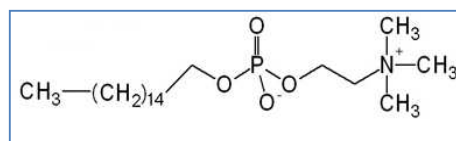
**Figura 4.** Estructura de la Amfotericina B.

Recientemente se ha utilizado la **azitromicina** para el tratamiento de la leishmaniasis en mucosa, la cual actúa inhibiendo del RNAm directo al polipéptido y a la síntesis proteínas.<sup>(2,8)</sup> Por otro lado, la **miltefosina**, que es un análogo de fosfocolina originalmente desarrollado para el cáncer, el cual inhibe a los sistemas enzimáticos en la membrana celular y la inhibición de la biosíntesis fosfatidilcolina. Se ha ocupado para el tratamiento de leishmaniasis cutánea<sup>(9)</sup> y visceral<sup>(10)</sup>; sin embargo, causa severos problemas gastrointestinales (Figura 5).<sup>(11)</sup>

a)



b)



**Figura 5.** Estructura Química de la (a) Azitromicina y (b) Miltefosina.

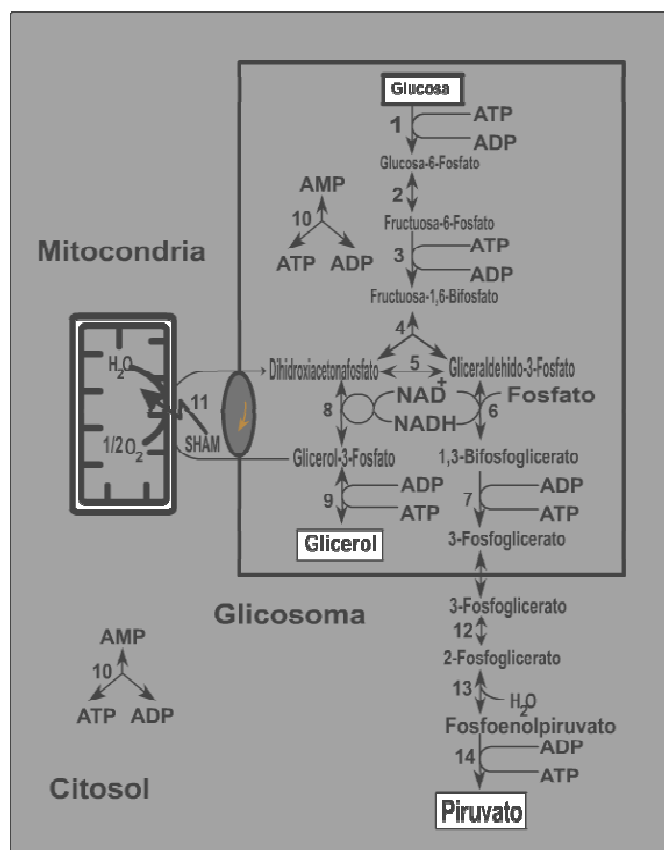


---

Con el paso del tiempo se han realizado nuevos avances en la terapéutica de esta enfermedad y ahora se han descubierto nuevas aplicaciones a otros medicamentos como el **alopurinol**, que es un compuesto de pirazolpirimidina, el cual está siendo estudiado en el tratamiento de la leishmaniasis, además de que su administración es por vía oral; su mecanismo de acción, consiste en afectar la síntesis proteica e inhibir la función del RNA por medio del metabolismo de las purinas. Existe la **aminosidina / paramomicina**, esta combinación es empleada con el cloruro de metilbenzetonio o urea, en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea; la cual ha presentado prometedores resultados inhibiendo la síntesis proteica y ribosomal.

Los **Azoles**, como ya se mencionó anteriormente son empleados para tratar la leishmaniasis cutánea. En estudios recientes el **itraconazol**, presenta excelentes resultados, por su mecanismo de acción (inhibición del citocromo P-450 dependiente de lanosterol C14 desmetilasa).

Dado que no existe una amplia gama farmacológica para el tratamiento terapéutico de la leishmaniasis, y que hay medicamentos y combinaciones de estos en prueba, es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos. Un enfoque en la búsqueda de dichos compuestos involucra la obtención de inhibidores en contra de una enzima del parásito, que puedan servir como guías para el diseño de moléculas que potencialmente logren utilizarse como agentes terapéuticos. En este sentido, una característica interesante en el metabolismo de los tripanosomátidos es que son altamente dependientes de la glucólisis como fuente para la producción de ATP. Esta gran dependencia de la glucólisis como fuente de energía hace de las enzimas de esta ruta metabólica, blancos atractivos para el diseño de fármacos. Además, es importante recordar que en los tripanosomas las 7 primeras enzimas de la ruta se encuentran localizadas en un organelo, aparentemente único en los tripanosomátidos, que se ha llamado glicosoma (Figura 6).<sup>(12)</sup>



**Figura 6.** Organización de las enzimas glucolíticas en el tripanosoma.

1. Hexocinasa, 2. Hexosa fosfato isomerasa, 3. Fosfofructocinasa, 4. aldolasa  
 5. Triosa fosfato isomerasa, 6. Gliceroldehido-3-fosfato deshidrogenasa, 7.  
 Fosfoglicerato cinasa, 8. Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, 9. Glicerol cinasa,  
 10. Adenilato cinasa, 11. Glicerol-3-fosfato cinasa, 12. Fosfoglicerato mutasa,  
 13. Enolasa, 14. Piruvato cinasa, **SHAM** ácido salicilhidroxámico, **ADP**  
 adenosin difosfato, **AMP** adenosin monofosfato, **ATP** adenosin trifosfato, **NAD<sup>+</sup>**  
 nicotinamin adenin dinucleótido oxidado, **NADH** nicotinamin adenin dinucleótido  
 reducido. Tomado de Oppendoes et al., 2001.

---

## 2.2 La triosafosfato isomerasa (TIM) como el blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios.

En términos generales varios grupos de investigadores consideran a las enzimas de la glucólisis anaeróbica como buenos blancos para el diseño de fármacos en contra de parásitos tripanosomátidos. Esto es particularmente cierto para *Trypanosoma brucei*, ya que en su etapa infectiva, estos organismos carecen de mitocondrias funcionales. Respecto a la glicólisis anaeróbica, es importante recordar que en los tripanosomas las 7 primeras enzimas de la ruta se encuentran localizadas en un organelo, aparentemente único en los tripanosomátidos, que se ha llamado glicosoma. La Figura 1 muestra la localización de las enzimas de la glicólisis anaeróbica en *T. brucei*, en *L. mexicana* la distribución de las enzimas es similar. Además, varios de los mecanismos de regulación no son operantes en las enzimas de los tripanosomas debido a que las enzimas de este organismo tienen características estructurales y/o cinéticas distintas a las de los mamíferos.

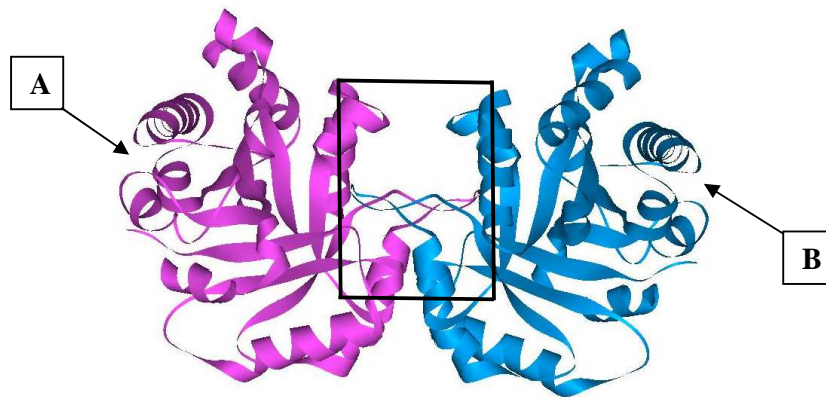
Dentro de las enzimas glucolíticas se ha propuesto a la TIM como blanco para el diseño de fármacos contra los tripanosomátidos.<sup>(13,14,15)</sup> En relación a la TIM, los estudios de flujo metabólico de la glucólisis en el tripanosoma y en glicosomas muestran que la TIM no es un punto de control en el flujo de la ruta,<sup>(16)</sup> y por tanto no sería un buen blanco. En contraste con la conclusión de estos autores, se observó que la TIM es esencial para la supervivencia de la forma sanguínea del tripanosoma.<sup>(17)</sup> También Helfert y colaboradores (2001) encontraron que con menos del 15% de la actividad de los controles, los tripanosomas no sobreviven. Los autores ofrecen dos posibles explicaciones de por qué la TIM es esencial para el parásito. Mediante un modelo computacional del flujo metabólico se predice que en ausencia de la TIM, los tripanosomas en su fase infectiva no producen suficiente ATP. Esto podría ser mortal para el tripanosoma. Por otra parte, a concentraciones bajas de TIM se acumula dihidroxiacetona fosfato (DHAP) en el glicosoma, que inhibe la aldolasa (Figura 6). Además, la DHAP se puede convertir espontáneamente a metilglioxal, que es tóxico para el parásito.

---

### 2.3 Estructura de la triosafosfato isomerasa (TIM).

La TIM es una enzima homodimérica, cada monómero está formado por unos 250 residuos de aminoácidos. La TIM cataliza la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La interfase entre los dos monómeros de la TIM es relativamente grande, aproximadamente 1400 Å<sup>2</sup> (Figura 7). Está formada principalmente por el asa 3 de una subunidad que se internaliza en la otra y rodea la cadena lateral del residuo en la posición 14 de esta. Además, en la TIM de *Leishmania mexicana* (LmTIM) el residuo 14 es una cisteína (Cys14), mientras que en la TIM del humano este residuo es una metionina (Met14).

Hasta ahora se conoce la secuencia de aminoácidos de la TIM de aproximadamente 180 especies y la estructura tridimensional de la TIM de pollo,<sup>(18)</sup> levadura,<sup>(19)</sup> *Trypanosoma brucei*,<sup>(20)</sup> *Escherichia coli*,<sup>(21)</sup> humano,<sup>(22)</sup> *Bacillus stearothermophilus*,<sup>(23)</sup> *Plasmodium falciparum*,<sup>(15)</sup> *Vidrio marinus*,<sup>(24)</sup> *Trypanosoma cruzi*,<sup>(25)</sup> *Leishmania mexicana*,<sup>(26)</sup> *Thermotoga marítima*,<sup>(27)</sup> *Pyrococcus woesei*,<sup>(28)</sup> *Entamoeba histolytica*,<sup>(29)</sup> *Caenorhabditis elegans*,<sup>(30)</sup> *Thermoproteus tenax*<sup>(31)</sup> y *Methanocaldococcus jannaschii*.<sup>(32)</sup>



**Figura 7.** Estructura tridimensional de la triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana*. Los monómeros **A** y **B** se muestran en color morado y azul claro respectivamente. En el rectángulo se muestra la interfase de la enzima.

---

## 2.4 La interfase de enzimas oligoméricas como blanco para el diseño de fármacos.

Sí se acepta que la TIM puede ser un buen blanco para el desarrollo de moléculas que interfieran con su función, es necesario entonces determinar el sitio sobre el cual se va a diseñar una molécula inhibitoria o desestabilizante de su estructura. Muchos de los intentos por inhibir la función biológica de las proteínas por agentes químicos se han enfocado al desarrollo de moléculas que actúen a nivel del sitio catalítico de las enzimas, o en los alostéricos (sitios de unión para los agonistas o antagonistas en los receptores). Ambos criterios se han utilizado cuando el interés es encontrar agentes con potencial uso terapéutico contra parásitos. Sin embargo, se sabe que los sitios catalíticos son ampliamente conservados. Por lo tanto, puede ser que las diferencias entre los sitios activos de enzimas homólogas sean pequeñas o irrelevantes. Estas observaciones indican que no todas las enzimas de los parásitos pueden ser buenos candidatos para diseñar moléculas dirigidas al sitio catalítico.<sup>(33)</sup>

Es entonces necesario buscar si otros sitios de las enzimas se pueden utilizar en la búsqueda de moléculas que perturben su función. En este punto es importante mencionar que la TIM sólo es activa en su forma dimérica.<sup>(34)</sup> Por lo tanto, la perturbación de la asociación entre sus monómeros por una molécula pequeña debe acabar con su función catalítica.

En vista de las numerosas interacciones proteína-proteína que existen en los organismos vivos <sup>(35)</sup>, varios grupos han contemplado la opción de utilizar como blanco las interfases proteína-proteína para la inhibición de las enzimas y por consiguiente de las funciones celulares. Bajo este enfoque se ha tratado de encontrar agentes que prevengan o induzcan la asociación de proteínas que inicien o estén involucradas en las vías de transducción de señales. De igual forma se han tratado de encontrar moléculas que perturben la asociación de monómeros en enzimas que sólo son activas en estado oligomérico.

En algunos estudios se buscaron moléculas pequeñas (péptidos imitadores o miméticos) que reproduzcan las interacciones de una proteína con otra. Se ha tenido éxito con la proteasa del VIH<sup>(36)</sup>, la ribonucleótido reductasa del virus *Herpes simplex*<sup>(37)</sup> y la DNA polimerasa HSV.<sup>(38)</sup> También se ha interferido

---

exitosamente con los contactos proteína-proteína por medio de moléculas no peptídicas. Dos de estos ejemplos son la sintetasa del óxido nítrico <sup>(39)</sup> y la transtirretina.<sup>(40)</sup> Todos estos datos apoyan la idea de que es posible interferir en la asociación entre los monómeros de proteínas oligoméricas.

La importancia de la interfase en la estabilidad y catálisis de la TIM, se ha estudiado en la enzimas de *T. brucei*, humano y en la TIM de *T. cruzi*. Los resultados mostraron que la sustitución del residuo en la posición 14 por otros residuos, causa cambios estructurales muy drásticos y pérdida total de la actividad catalítica.<sup>(41)</sup> Además, se ha descrito que la modificación de los residuos del asa 3 genera enzimas con constantes de asociación bajas.<sup>(42)</sup>

Este mismo fenómeno se observa cuando la Cys14 se modifica químicamente. <sup>(29,43)</sup> También es de interés que un péptido con la secuencia de aminoácidos del asa 3 en la TIM de *Plasmodium falciparum* causa la inactivación de la enzima<sup>(44)</sup> y que algunos derivados de benzotiazol inactivan la TIM de *T. cruzi* actuando a nivel de la interfase de la enzima.<sup>(45,46)</sup> Por otro lado, existen datos que indican que esta porción de la interfase juega un papel dinámico en la catálisis enzimática.<sup>(47,48)</sup> Además, cabe mencionar que la TIM solo es activa en su forma dimerica.<sup>(34)</sup>

Los datos anteriores sugieren que esta región en la TIM es fundamental para mantener la integridad del dímero, y que ésta puede ser un blanco para perturbar su función.

Dentro de las diversas metodologías utilizadas para el descubrimiento de nuevos fármacos, se encuentran la simulación del reconocimiento por computadora o “**DOCKING**” de la cual se hace una descripción a continuación.

---

## 2.5 Simulación del reconocimiento “DOCKING”.

El **docking** es una técnica computacional que consiste en simular el acoplamiento entre una proteína o receptor y un ligando. En general este último es un compuesto orgánico pequeño aunque también puede simularse el reconocimiento entre dos macromoléculas. Cuando se trata de encontrar un inhibidor, se utiliza una quimioteca o base de datos con moléculas que cumplan las características que se conocen para fármacos potenciales. Estas bibliotecas de compuestos están disponibles a través de compañías particulares que también suministran los compuestos seleccionados por *docking* para realizar ensayos *in vitro*. Es necesario contar con la estructura tridimensional del receptor, además de conocer la región sobre la superficie de esa molécula en la que se realizará la simulación.

La base de datos de ligandos debe ser preparada con la asignación de cargas eléctricas parciales a cada átomo, y la conversión de la fórmula estructural de los diferentes compuestos a una estructura tridimensional en un mínimo de energía. De igual forma se asignan cargas parciales a los átomos del receptor, y definir una región alrededor del sitio de unión propuesto, en donde se construye una malla. A continuación se precalcula la afinidad por la proteína que tendrían los diferentes tipos de átomos que constituyen a los ligandos cuando se encontraran en cada uno de los sitios de la malla. Los resultados obtenidos se almacenan en la memoria de la computadora para su uso posterior.

Una vez cumplidos los prerrequisitos, la simulación inicia con la colocación del primer ligando de la quimioteca en varios miles de orientaciones dentro del sitio de unión. Las afinidades precalculadas para cada átomo se suman para estimar un puntaje o interacción en cada orientación probada. Finalmente, se almacena la mejor orientación de ese ligando y se repite la operación para las demás moléculas de la base de datos. La selección de compuestos se realiza por comparación de las interacciones estimadas. Cada programa puede usar uno o más criterios basados en diferentes consideraciones, por ejemplo, en la evaluación de la complementariedad geométrica entre el sitio de unión y del ligando (criterio de contactos), en el conteo del número de interacciones

---

intermoleculares, por reglas empíricas (criterio químico) o bien utilizando un potencial similar a los campos de fuerza empleados en las simulaciones de mecánica molecular (criterio de campos de fuerza).<sup>(49)</sup>

La idea que subyace en esta metodología es que entre los compuestos que muestren las afinidades más altas por el receptor se encontrarán aquellos que logren la mayor inhibición en la enzima en los ensayos *in vitro*.

Este enfoque ya ha sido utilizado con éxito en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS) teniendo como blanco la proteasa del coronavirus<sup>(50)</sup>, así como en el diseño de inhibidores de las enzimas del citocromo P450<sup>(51)</sup>, inhibidores de RNA<sup>(52)</sup>, e inhibidores de la Desacetilasa de histonas.<sup>(53)</sup>

De igual forma el docking se ha utilizado para evaluar teóricamente algunos compuestos, por ejemplo tres nuevos híbridos moleculares de los fármacos tacrina y donepezil, usados en la enfermedad de Alzheimer, para su investigación y validación experimental.<sup>(54)</sup>



---

### 3. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que se presenta en regiones tropicales y subtropicales, causada por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, cuyas manifestaciones clínicas pueden ser cutáneas, mucocutáneas y/o viscerales, según sea la especie.

La incidencia de esta infección parasitaria ha aumentado en los últimos años, según la OMS se estima que aproximadamente 12 millones de personas están infectadas de leishmaniasis en todo el mundo, con una mortalidad anual de cerca de 50 000 y la población en riesgo es de 350 millones de personas, de los cuales alrededor de 1,5 a 2 millones de nuevos casos se presentan anualmente.

En México, la principal manifestación clínica es la Leishmaniasis cutánea, cuyo agente etiológico es *Leishmania mexicana* y varias subespecies. Su distribución abarca desde el sureste de México, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Tabasco, Campeche y Quintana Roo.

Además, el impacto en el aspecto social, es un punto importante ya que las personas infectadas llegan a ser objeto de discriminación en distintos niveles, entre ellos el laboral, lo cual repercute negativamente en la economía de los países.

Para esta enfermedad, los medicamentos de elección clásicamente han sido los antimoniales pentavalentes, su administración es parenteral y entre sus reacciones adversas destacan daño renal y hepático. Por tal motivo surgen nuevas alternativas como la pentamidina (esta indicada para el tratamiento de la LMC) y la anfotericina B (indicada para la LV y LMC), ambos medicamentos están indicados en caso de resistencia a los antimoniales pentavalentes, sin embargo la pentamidina causa graves reacciones adversas como disrritmias cardíacas, daño hepático y renal; mientras que la anfotericina B que provoca reacciones anafilácticas, destacando “el síndrome del niño rojo”, y por lo cual se ha restringido su utilización. Recientemente surgieron alternativas como la miltefosina, la azitromicina y el ketoconazol. Los cuales presentan reacciones

---

adversas graves que abarcan desde la presencia de disritmias cardiacas, daño renal y hepático, convulsiones y dermatitis por contacto. Por lo tanto, debido a la pérdida de eficacia, dificultades en la administración de algunos medicamentos y la aparición de cepas resistentes a los mismos, así como el incremento en la frecuencia y la severidad de las reacciones adversas del tratamiento han forzado la búsqueda de moléculas que puedan servir como guía en la obtención de nuevos medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad.

---

#### **4. HIPÓTESIS**

Al ser una enzima activa solamente en su forma dimérica, la unión de moléculas pequeñas en la interfase entre los dos monómeros de la LmTIM puede generar cambios conformacionales que provoquen la inactivación de la enzima.

---

## 5. OBJETIVO GENERAL

Buscar mediante **docking**, moléculas pequeñas que se unan en la interfase de la triosafosfato isomerasa de la *Leishmania mexicana*, las cuales sean capaces de inactivarla.

## 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Generar una biblioteca de las moléculas de la base datos de Tripos en su conformación de mínima energía.
- 2.- Efectuar el docking de las moléculas en la interfase de la LmTIM.
- 3.- Seleccionar las 200 moléculas con mayor afinidad por la interfase de la LmTIM de acuerdo a los resultados del docking.
- 4.- Probar la capacidad de inactivación de la LmTIM de las moléculas seleccionadas por docking.

---

## 7. METODOLOGÍA

**7.1 Moléculas Ensayadas.** Todas las moléculas ensayadas fueron de origen sintético con diversa estructura química, adquiridas de la compañía Tripos. Además, las moléculas que componen esta base de datos, cumplen con las reglas de Lipinski,<sup>(42)</sup> las cuales indican que para ser consideradas como farmacóforos, deben tener un peso molecular <500 Da, ser hidrofóbicas, no tener más de 5 donadores de H<sup>+</sup> y no más de 10 aceptores de H<sup>+</sup>.

**7.2 Reactivos.** Todo el stock de reactivos utilizados fueron comprados de la compañía Sigma-Aldrich, con un grado de pureza mayor de 95%.

**7.3 Generación de la biblioteca de moléculas en su conformación de mínima energía.** La biblioteca de moléculas para realizar la simulación se obtuvo de la compañía Tripos ([leadquest.tripos.com](http://leadquest.tripos.com)), la cual se encontraba en dos dimensiones. La razón de utilizar esta, es porque la compañía aseguro la disponibilidad comercial de las moléculas seleccionadas con una pureza promedio cercana al 90%. Esta librería (base de datos) contiene actualmente alrededor de 50,000 moléculas y fue preparada con la asignación de cargas eléctricas parciales y optimización de geometrías por el paquete computacional MOE (Molecular Oriented Environment, [www.chemcomp.com](http://www.chemcomp.com)).

**7.4 Realización del Docking.** El sitio de unión del ligando en la interfase de la LmTIM se definió computacionalmente con la herramienta de sitios alfa implementada en MOE. Con este mismo paquete se modelaron los átomos de hidrógeno de la proteína y se asignaron sus cargas parciales. En el docking se probaron 5000 orientaciones aleatorias para cada ligando, con una variación mínima en posición y rotación moleculares de 1.0 Å y 1°, respectivamente.

---

**7.5 Selección de las moléculas.** Con base en los resultados obtenidos en el docking, se seleccionaron las 200 moléculas con mayor afinidad por la interfase de la enzima, las cuales fueron ensayadas para determinar su capacidad de inactivación de la LmTIM. Lo anterior nos permitió eliminar los falsos positivos y seleccionar las moléculas con mayor capacidad de inactivación.

**7.6 Enzimas.** La TIM de *L. mexicana* fue recombinante. Esta enzima ya purificada fue proporcionada por el laboratorio de Bioquímica del Dr. Armando Gómez Puyou del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

**7.7 Preparación del sustrato.** La presentación utilizada del Gliceraldehido-3-fosfato (G3P) fue como sal de bario, por lo que se le dio un tratamiento para eliminarla, para ello se utilizó una resina dowex de malla 200X. Se pesó 1.5g de resina en un tubo de ensayo, y se lavó 5 veces con un volumen de 5 ml agua destilada por vez agitando por 1 min., posteriormente se quitó el sobrenadante; una vez limpia la resina se le agregaron 100mg de G3P y 5mL de agua destilada hirviendo, enseguida se puso a baño maría por 3.15 min. con agitación constante, una vez cumplido el tiempo se colocó inmediatamente en el hielo para dejarlo enfriar, posteriormente el sustrato se filtró y se ajustó a pH 5 agregando pizcas de bicarbonato de sodio.

**7.8 Actividad.** La actividad de la LmTIM se midió en un espectrofotómetro de arreglo de diodos, marca Agilent modelo 8453, mediante un sistema acoplado utilizando  $\alpha$ -glicerol fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ GDH), en la dirección de GAP a DHAP a 25 °C en 1 ml de medio a pH 7.4, que contiene 100 mM de trietanolamina, 10 mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 0.2 mM de dinucleótido de nicotinamina adenina reducido (NADH), 0.9 unidades de  $\alpha$ GDH, y 1 mM de GAP. La reacción se inició con la TIM, generalmente a 5 ng. La  $\alpha$ GDH reduce la DHAP producida por la TIM a glicerol-3-fosfato utilizando NADH que se oxida a NAD<sup>+</sup>. El NADH absorbe a 340 nm, el decremento en esta absorbancia respecto al tiempo se va a utilizar para calcular la actividad de la TIM.

---

$$\text{Actividad de la Enzima } (\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{(\Delta\text{OD})(V)}{\xi\text{NADH}}$$

Donde:

$\Delta\text{OD}$ = Cambio de absorbancia por minuto

V= Volumen de la celda en mililitros

$\xi\text{NADH}$ = Coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm, que es

6.22

El porcentaje de actividad en presencia de la molécula, se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ Act.} = \frac{\text{Act. de la enzima en presencia de la molécula}}{\text{Act. de la enzima en ausencia de la molécula}} \times 100$$

**7.9 Ensayos de inactivación.** La enzima se incubó a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4; en ausencia o en presencia de la molécula pequeña a una concentración de 200 $\mu\text{M}$ . La incubación se llevó a cabo a 36 °C por 2 horas. Al término, se tomó una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  para medir su actividad.

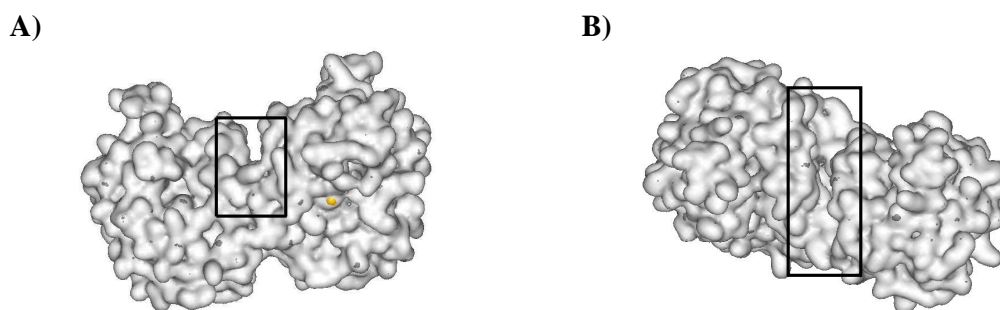
El porcentaje de inactivación se calculó, mediante la siguiente fórmula, tomando como 100% la actividad de la enzima en ausencia de la molécula:

$$\% \text{ Inactivación} = 100 \% - \% \text{ Act. de la enzima en presencia de la molécula}$$

---

## 8. RESULTADOS

En la búsqueda de nuevas moléculas guía para el desarrollo de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis, en el presente trabajo se utilizó un enfoque computacional mediante una metodología de simulación del acoplamiento conocida como docking. Teniendo como blanco la triosafosfato isomerasa de *L. mexicana* (LmTIM) y de manera particular la interfase de la misma (Figura 8).

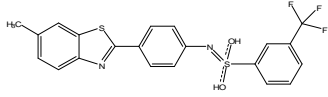
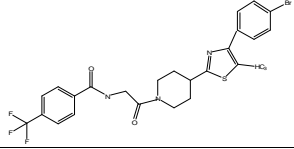
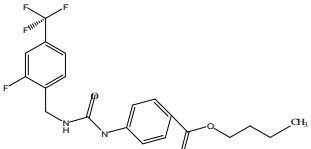
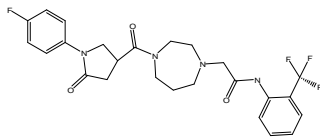
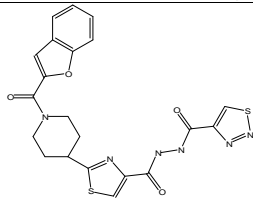
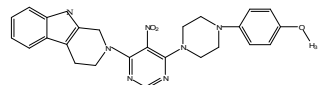
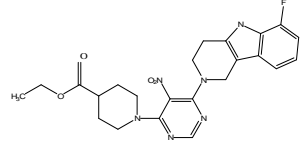
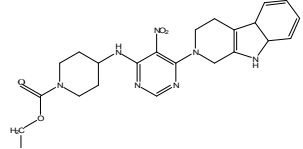
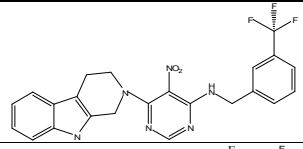
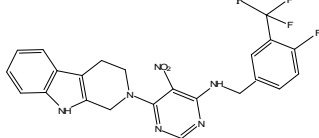


**Figura 8.** Interfase de la LmTIM, **A)** Vista lateral y **B)** Vista superior de la interfase de la LmTIM. La región está enmarcada en un rectángulo.

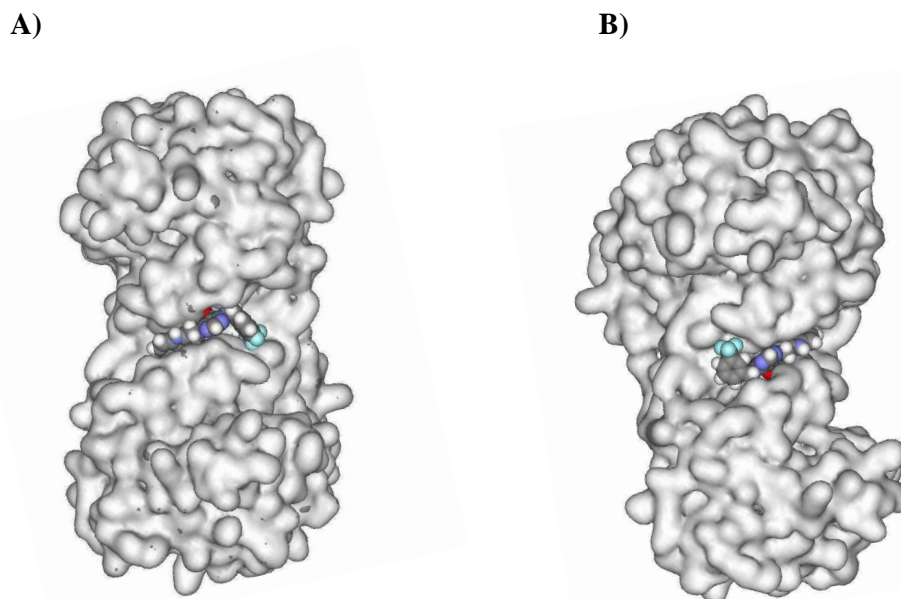
El docking se realizó utilizando una base de datos de moléculas pequeñas de aproximadamente 50,000 compuestos. De estos, se compraron los 200 que tuvieron la mejor energía de unión en la interfase de la LmTIM de acuerdo al docking. Las 200 moléculas se ensayaron a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , bajo las condiciones descritas en la metodología. En la tabla 1 se muestran las estructuras de 10 de estas moléculas, incluyendo las dos que inactivaron a la LmTIM (**compuestos 9 y 10**).



**Tabla 1.** Moléculas seleccionadas por docking para la inactivación de la LmTIM.

Compuesto	Estructura	% Inactivación
1		0%
2		0%
3		0%
4		0%
5		0%
6		0%
7		0%
8		0%
9		35%
10		35%

De estos dos compuestos (**9** y **10**) se realizó un análisis detallado de su interacción con la enzima. En la Figura 9 se muestra una imagen de la unión de cada uno de estos compuestos en la interfase de la LmTIM. Los datos obtenidos indicaron que el compuesto interactúa con aminoácidos de ambos monómeros (Tabla 2).



**Figura 9.** Acoplamiento de las **moléculas 9 (A)** y **10 (B)**, sobre la interfase. La enzima se muestra con su superficie de Conolly y los compuestos en CPK.

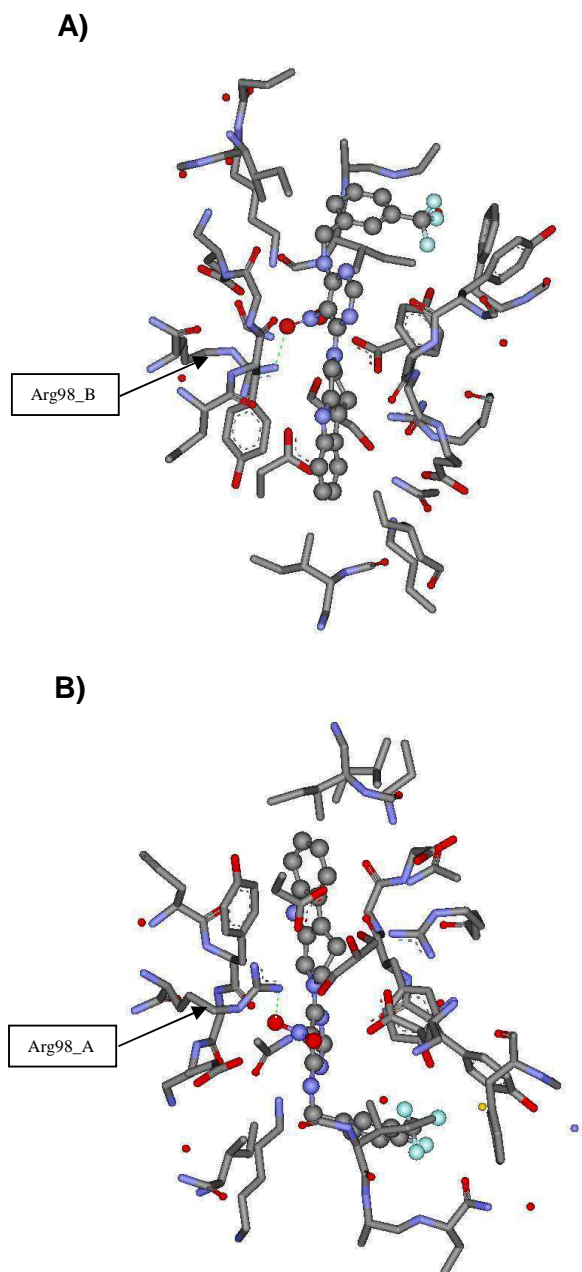
**Tabla 2.** Residuos del Monómero A y Monómero B de la LmTIM a menos de 5Å de los compuestos **9** y **10**.

Compuesto	Monómero A	Monómero B
<b>9</b>	Tyr 101, Tyr 102, Gly 103, Arg 98, Glu 77, Glu 104, ILE 68, ILE 108, Lys 112, Ala 69, Phe 74, Ala 67, Asn 66	Tyr 101, Tyr 102, Gln 111, Gly 103, Arg 98, Glu 77, Glu 104, ILE 68, ILE 108, Lys 70, Ala 69, Phe 74, Asn 66, Lys 112
<b>10</b>	Tyr 101, Tyr 102, Gly 103, Arg 98, Lys 112, ILE 68, Ala 67, Glu 77, Phe 74, Asn 66	ILE 68, ILE 108, Glu 77, Glu 104, Phe 74, Tyr 101, Tyr 102, Arg 98, Gly 103, Lys 112

---

### 8.1 Puentes de hidrógeno entre las moléculas 9 y 10 con respecto a los residuos de ambos monómeros.

El **compuesto 9** forma puentes de hidrógeno entre su oxígeno (O3) y el N de la Arg98 del monómero A. Mientras que la **molécula 10** presenta de igual forma un puente de hidrógeno pero en este caso es entre el oxígeno (O3) de este y el N de la Arg98 del monómero B (Figura 10).

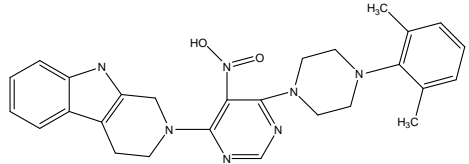
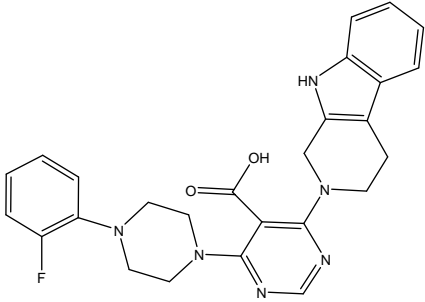
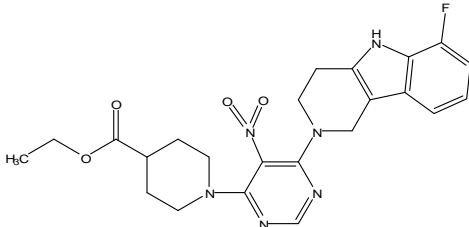


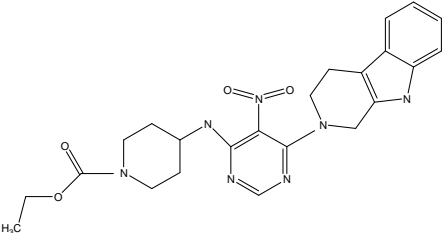
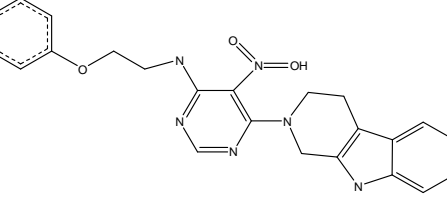
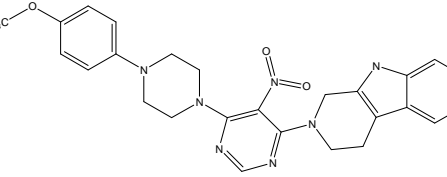
**Figura 10.** Puentes de hidrógeno formados entre el **compuesto 9 (A)** y el **compuesto 10 (B)** con la LmTIM.

## 8.2 Moléculas con una estructura similar, pero que no inactivaron a la LmTIM.

Por otro lado, con la finalidad de determinar que parte de las moléculas que inactivaron a la LmTIM era la importante para este efecto, se llevó a cabo una búsqueda dentro de las moléculas que se ensayaron, de aquellas con una estructura similar a la 9 y 10 pero que no inactivaron a la enzima (Tabla 3).

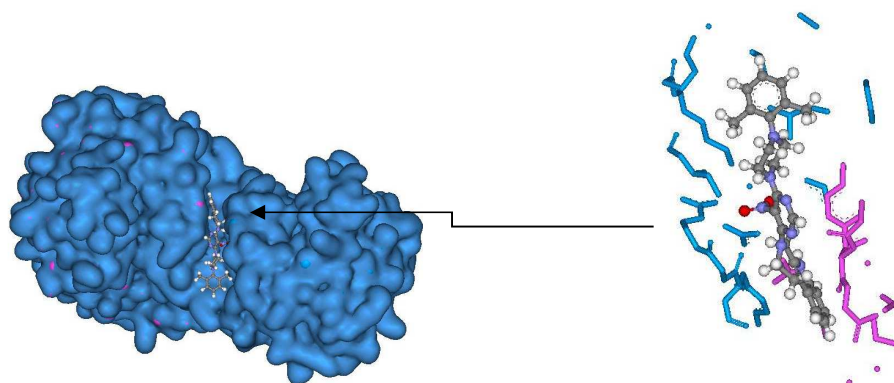
**Tabla 3.** Residuos a menos de 5 Å de la molécula 11 a la 16.

Compuesto	Estructura	Monómero A	Monómero B
11		Glu 77, ILE 68, Lys 112, Glu 104, ILE 108, Arg 98, Gly 103, Tyr 101 y 102	Arg 98, Glu 77, ILE 68, Phe 74, Lys 70, Ala 69, glu 115, Gln 111, Lys 112, ILE 108, Glu 104, Gly 103, Tyr 101 y 102
12		Glu 77, ILE 68 y 108, Ala 69, Lys 70, Glu 104 y 115, Gln 111, Lys 112, Arg 98, Tyr 102 y Gly 103	Glu 77 y 104, ILE 68, Lys 112, Ala 67, Asn 66, Arg 98, Gly 103, Tyr 101 y 102
13		Glu 77, ILE 68, Ala 67, Lys 112, ILE 108, Asn 66, Glu 104, Gly 103, Tyr 102, Tyr 101 y Arg 98	Lys 112, Asn 66, Glu 104 y 77, Phe 74, ILE 68 y 108, Gly 103, Arg 98, Tyr 101 y 102

14		Glu 77 y 104, Phe 74, Lys 112, ILE 68 y 108, Arg 98, Tyr 101 y 102	ILE 68 y 108, Ala 67, Lys 112, Asp 66, Glu 77 y 104, Arg 98, Gly 103, Tyr 101 y 102
15		ILE 68 y 108, Lys 112, Glu 77 y 104, Gly 103, Arg 98, Tyr 101 y 102	Tyr 101 y 102, Glu 77 y 104, ILE 68, Ala 67 y 69, Asp 66, Lys 112, Arg 98 y Gly 103
16		Tyr 101 y 102, Arg 98, Asp 66, Glu 77 y 104, Gly 103, Lys 112, ILE 108	Tyr 101 y 102, Gly 103, Glu 77, 104 y 115, Arg 98, ILE 68 y 108, Lys 70 y 112, Asp 66, Phe 74, Ala 69 y Gln 111

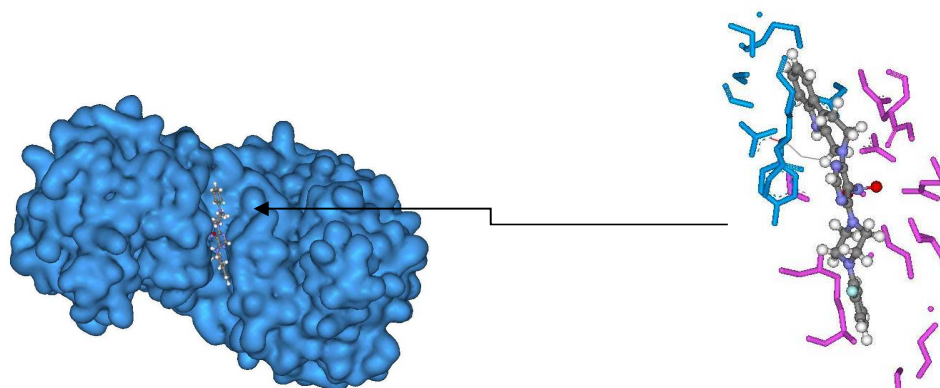
Los compuestos 11 y 12 no presentaron ninguna interacción a pesar de que cuentan con el mismo núcleo de las **moléculas 9 y 10**. Sin embargo, las moléculas 13, 14, 15 y 16 sí formaron puentes de hidrógeno. El compuesto 13 lo formó entre su O(2) y el N de la Arg98 del monómero A y un segundo puente entre su O(3) y el N de la Arg98 del monómero B. El compuesto 14 presentó un puente entre su O(3) y el N de la Arg98 del monómero B. Por su parte el compuesto 15 lo hizo entre su O(2) y el N de la Arg98 del monómero A. Además, formó un segundo puente entre su O(3) y el N de la Arg98 del monómero B. Por último, la molécula 16 lo formó entre su O(2) y el NZ de la Lisina112 del monómero B (Figuras 11 y 12).

A)



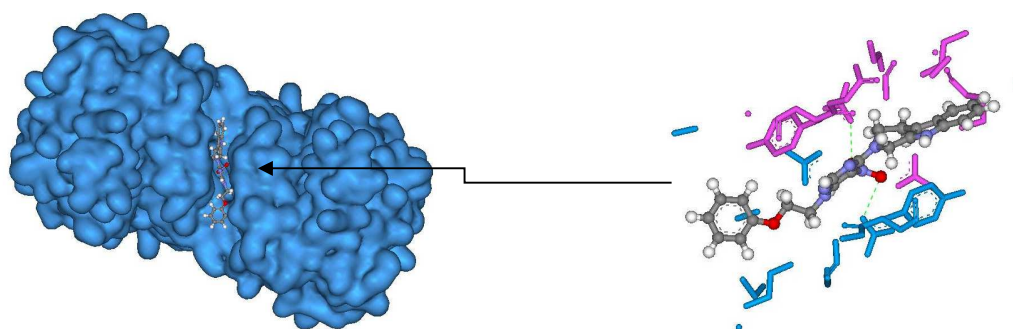
Compuesto 11

B)



Compuesto 12

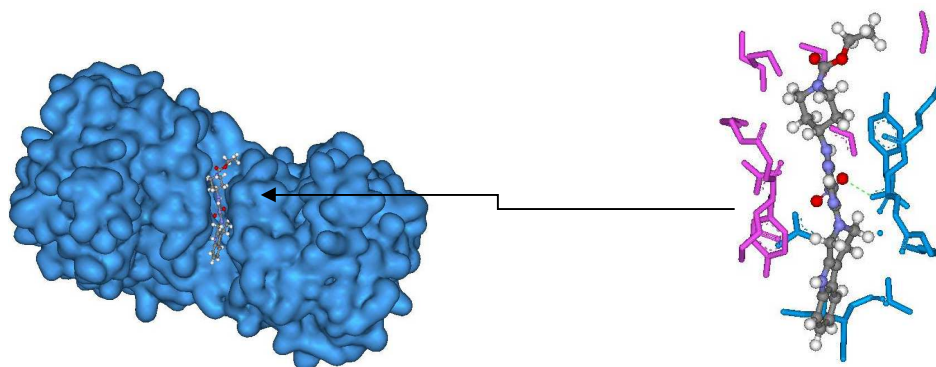
C)



Compuesto 13

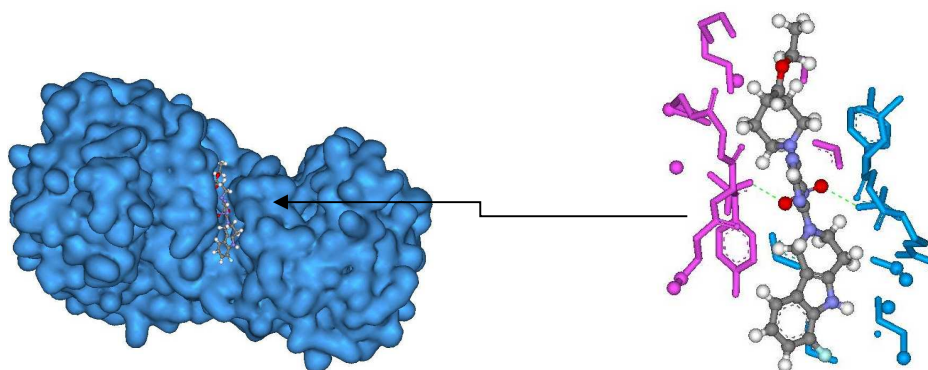
**Figura 11.** Vista del acomodo en la interfase de los compuestos 11 y 12 que no presentan puentes de hidrógeno, mientras que el compuesto 13 si.

D)



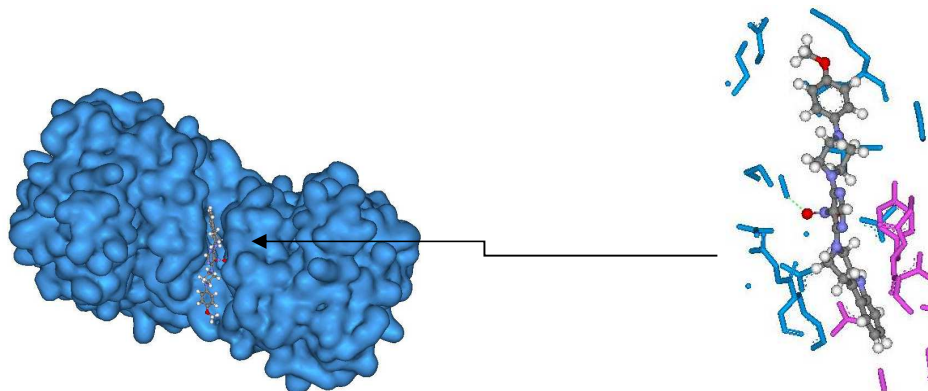
Compuesto 14

E)



Compuesto 15

F)



Compuesto 16

**Figura 12.** Representación de la interfase y formación de puentes hidrógeno de las moléculas 14, 15 y 16 pero que no presentaron actividad.

---

## 9. DISCUSIÓN

Las enfermedades parasitarias como la Leishmaniasis, son causantes de un incremento en las tasas de morbi-mortalidad en el mundo, aunado a esto, se sabe que los fármacos disponibles actualmente para tratar infecciones como la leishmaniasis presentan un gran número de desventajas, incluyendo RAM's, pobre eficacia clínica, y un incremento en los problemas de resistencia a los fármacos, así como su vía de administración, que para la mayoría es parenteral. Por lo cual existe la necesidad urgente de nuevos fármacos que actúen en nuevas dianas terapéuticas para hacer frente a estas enfermedades.

En el presente trabajo se utilizó un enfoque computacional para la búsqueda de nuevos inactivadores de la triosafosfato isomerasa de *L. mexicana*, teniendo como blanco la interfase de la enzima. Se utilizó una base de datos de alrededor de 50,000 moléculas de las cuales se ensayaron in vitro, las 200 que tenían la mejor energía de unión de acuerdo al docking. De estos estudios se encontraron dos moléculas capaces de inactivar a la LmTIM, denominadas compuestos 9 y 10. Los ensayos se realizaron a 200  $\mu\text{M}$ , que no es una concentración baja pero que para una primera etapa de selección es aceptable. Los datos obtenidos indicaron que a esta concentración, tanto el compuesto 9 como el 10 inactivaron un 35% la LmTIM (Tabla 1).

Un análisis estructural mas detallado de la interacción de estas moléculas con la enzima, mostró que residuos de ambos monómeros de la LmTIM se encuentran a menos de 5Å del compuesto y que se ubican en un parche hidrofóbico de la enzima, es decir, la mayoría de los aminoácidos que forman el sitio de unión son aromáticos o de cadena lateral alifática (Tabla 2). No obstante, se encontró que también formaron puentes de hidrógeno, en el caso del compuesto 9 fue con la Arg98 del monómero A y para el compuesto 10 fue con la Arg98 del monómero B (Fig. 10).

Estructuralmente ambos compuestos son casi idénticos, solo difieren en que el compuesto 10 solo tiene un átomo de fluor más como sustituyente, lo cual quizás influyó en la diferencia en la orientación de ambas moléculas al unirse a la enzima (Fig. 9).



---

Por otro lado, en un análisis de las moléculas con estructura similar que se ensayaron *in vitro*, pero que no inactivaron a la LmTIM, se encontró que no interactuaron con los mismo residuos del parche hidrofóbico como lo hicieron los compuestos 9 y 10. Además, para el caso de los compuestos 11 y 12, estos no formaron puentes de hidrógeno. Los compuesto 13 y 15 formaron los dos puentes de hidrógeno que por separado tuvieron el 9 y el 10, el compuesto 14 formó el mismo puente de hidrógeno que el compuesto 10 (Tabla 3).

Una característica importante en estas moléculas es que todas carecen del anillo bencénico con el sustituyente trifluorocarbono, lo cual sugiere entonces que esta combinación es importante para lograr la inactivación de la enzima.

Finalmente después de todos los análisis efectuados podemos decir que el núcleo de los tres anillos unidos más el heterociclo de seis átomos de carbono y el anillo bencénico es la base para la búsqueda o síntesis de nuevas moléculas con diferentes sustituyentes que puedan tener mayor capacidad de inactivación y puedan servir como líderes en la obtención de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis.

---

## 10. CONCLUSIONES

- 1.- La interfase de la LmTIM fue un buen sitio blanco para la búsqueda de inhibidores de la LmTIM.
- 2.- Se encontraron dos nuevos inactivadores de la LmTIM, los cuales tienen estructuras completamente diferentes a los fármacos utilizados en la actualidad para el tratamiento de los diversos tipos de leishmaniasis.
- 3.- El arreglo de los compuestos 9 y 10 con sus tres anillos unidos más el heterociclo de seis átomos de carbono y el anillo bencénico, pueden servir como base para la síntesis de nuevas moléculas con mayor capacidad de inactivación.

---

## 11. PERSPECTIVAS

Una vez que se ha establecido el núcleo base para el inactivador, una posibilidad que se tiene es realizar una nueva búsqueda en la base de datos de moléculas pequeñas, pero ahora ya con la condición de que estas tengan dicho núcleo, pero con diferentes sustituyentes. Las cuales se adquirirán para realizar ensayos *in vitro*.

Una segunda opción es realizar la síntesis química de varios de estos, tratando de cubrir una gama de sustituyentes con propiedades hidrofóbicas diferentes.

Además, se puede ensayar el efecto de los **compuestos 9 y 10** en la TIM de otros parásitos y ver la posibilidad de que este núcleo pueda servir para la obtención de un multiparasitario.

---

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. **Sánchez SL, Sáenz AE, Pancorbo MJ, Zegarra DR, Garcés VN, Regis RA** Leishmaniasis: Dermatología Peruana. 2004, Lima may/ago.; 14 (2).
2. **Organización Mundial de la Salud.**  
<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.
3. **Espinoza L., Figueroa D., et. al.,** Parasitosis, Programa de Actualización Continua e Infectología., Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C., México, D.F., 1998.
4. **Rodríguez D. J.** Las enfermedades transmitidas por vectores en México., Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. Mayo-junio 2002; 45 (3): 134-136.
5. **Becerril M., A., Romero R.** Parasitología médica de las moléculas a la enfermedad, Ed. McGraw-Hill Interamericana, México, D. F., 2004: p. 65-72.
6. **Romero Cabello R.** Microbiología y Parasitología Humana, Bases Etiológicas de las Enfermedades Infecciosas, Ed. Médica Panamericana, 2da. Edición, México, D. F., 1999: 640-649.
7. **Olliaro, P. L., Bryceson, A. D. M.** Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. Parasitol. Today **9**; 1993:323-328.
8. **Silva-Vergara, M. L., Silva, L., Maneira, F. R. Z., Da Silva, A. G., Prata, A.** Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo **46**; 2004; 175-177.
9. **Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J .C., Diaz, A., et al.,** Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. Clin. Infect. Dis. **38**; 2004; 1266-1272.
10. **Prasad, R., Kumar, R., Jaiswal, B. P., Singh, U. K.** Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. Indian J. Pediatr. **71**; 2004; 143-144.
11. **Sangrula, H., Sharma,, K. K., Rijal, S., Dwivedi, S., Koirala, S.** Orally effective drugs for kala-azar (visceral leishmaniasis): focus on miltefosine and sitamaquine. J. Assoc. Physicians India. **51**; 2003; 686-690.

- 
12. **Opperdoes, F. R., Michels, P. A.** Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets. *Int. J. Parasitol.* 31; 2001: 482-490.
  13. **Noble, M. E. , Wierenga, R. K., Lambeir, A. M., Opperdoes, F. R., Thunnissen, A. M., Kalk, K. H., et. al.** The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 10; 1991: 50-69.
  14. **Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A, Pérez-Montfort R.** Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action studies with triosephosphate isomerase. *Chem. Biol.* 1995; 2:847-855.
  15. **Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Balaram, H., Balaram, P. & Murthy, M.R.N.** Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 5; 1997: 751-761.
  16. **Bakker, B. M., Michels, P. A., Opperdoes, F. R., Westerhoff, H. V.,** What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? *J. Biol. Chem.*, 274; 1999: 14551-14559.
  17. **Helfert, S., Estevez, A. M., Bakker, B., Michels, P., Clayton, C.,** Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 357; 2001:117-125.
  18. **Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko G. A, Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., et. al.** Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 255; 1975: 609-614.
  19. **Lolis, E., Petsko, G. A.** Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5 Å resolution: implications for catalysis. *Biochemistry* 29; 1990: 6619-6625.
  20. **Wierenga, R. K., Noble, M. E. M., Vriend, G., Nauche, S., Hol, W. G. J.** Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4 M-ammonium sulphate. A comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex. *J. Mol. Biol.* 220; 1991: 995-1015.

- 
21. Noble, M. E. M., Zeelen, J. P., Wierenga, R. K. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr. D* 49; 1993: 403-417.
22. Mande, S. C., Mainfroid, V., Kalk, K. H., Goraj, K., Martial, J. A., Hol, W.G.J. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. Triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein. Sci.* 3; 1994: 810-821.
23. Delboni, L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S., Vellieux, F. M. D., et. al. Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.* 4; 1995: 2594-2604.
24. Álvarez, M., Zeelen, J. P., Mainfroid, V., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Wyns, L., et. al. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 273; 1998: 2199-2206.
25. Maldonado, E., Soriano-Garcia, M., Moreno, A., Cabrera, N., Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., et. al. Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *J. Mol. Biol.* 283; 1998: 193-203.
26. Williams, J. C., Zeelen, J. P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P. A., Lambeir, A. M., Wierenga, R.K. Structural and mutagenesis studies of *leishmania* triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein. Eng.* 12; 1999: 243-250.
27. Maes, D., Zeelen, J. P., Thanki, N., Beaucamp, N., Alvarez, M., Thi, M. H., et. al. The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: a comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 37; 1999: 441-453.

- 
28. Walden, H., Bell, G. B., Rusell, R. J. M., Siebers, B., Hensel, R., Taylor, G. L. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 306; 2001: 745-757.
  29. Rodríguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Kornhauser, A., Fernández-Velasco, D. A. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* 322; 2002: 669-675.
  30. Symersky, J., Li, S., Carson, M., Luo, M. Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Proteins* 15; 2003: 484-486.
  31. Walden, H., Taylor, G. L., Lorentzen, E., Pohl, E., Lilie, H., Schramm, A., et. al. Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *J. Mol. Biol.* 342; 2004: 861-875.
  32. Gayathri, P., Banerjee, M., Vijayalakshmi, A., Azeez, S., Balaram, H., Balaram, P., Murthy, MR., Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus jannaschii*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 63; 2007: 206-220.
  33. Pérez-Montfort, R., de Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A. The interfaces of oligomeric proteins as targets for drug design against enzymes from parasites. *Curr. Top. Med. Chem.* 2; 2002: 457-470.
  34. Zabori, S., Rudolph, R., Jaenicke, R. Folding and association of triosephosphate isomerase from rabbit muscle. *Z. Naturforsch* 35C; 1980: 999-1004.
  35. Schwikowski, B., Uetz, P., Fields, S. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat. Biotechnol.* 18; 2000: 1257-61.
  36. Zutshi, R., Franciskovich, J., Shultz, M., Schweitzer, B., Bishop, P., Wilson, M., et. al. Targeting the dimerization interface of HIV-1 Protease: inhibition with cross-linked interfacial peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 119; 1997: 4841-4845.
  37. Liuzzi, M., Deziel, R., Moss, N., Beaulieu, P., Bonneau, A. M., Bousquet, C., et. al. A potent peptidomimetic inhibitor of HSV ribonucleotide reductase with antiviral activity in vivo. *Nature* 372; 1994: 695-698.

- 
- 38. Digard, P., Williams, K. P., Hensley, P., Brooks, I. S., Dahl, C. E., Coen, D. M.** Specific inhibition of herpes simplex virus DNA polymerase by helical peptides corresponding to the subunit interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92; 1995: 1456-1460.
- 39. McMillan, K., Adler, M., Auld, D. S., Baldwin, J. J., Blasko, E., Browne, L. J., et.al.** Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97; 2000: 1506-1511.
- 40. Peterson, S. A., Klabunde, T., Lashuel, H. A., Purkey, H., Sacchettini, J. C., Kelly, J. W.** Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95; 1998: 12956-12960.
- 41. Hernández-Alcántara, G., Garza-Ramos, G., Hernández, G. M., Gómez-Puyou, A, Pérez-Montfort, R.** Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* 41; 2002: 4230-4238.
- 42. Schliebs, W., Thanki, N., Jaenicke, R., Wierenga, R. K.** A double mutation at the tip of the dimer interface loop of triosephosphate isomerase generates active monomers with reduced stability. *Biochemistry* 36; 1997: 9655-9662.
- 43. Maithal, K., Ravindra, G., Balaram, H., Balaram, P.** Inhibition of plasmodium falciparum triose-phosphate isomerase by chemical modification of an interface cysteine. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of differential cysteine reactivities. *J. Biol. Chem.* 277; 2002: 25106-25114.
- 44. Singh, S. K., Maithal, K., Balaram, H., Balaram, P.** Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of Plasmodium falciparum triosephosphate isomerase by interface peptides. *FEBS Lett.* 501; 2001: 19-23.



- 
45. Téllez-Valencia, A., Avila-Rios, S., Pérez-Montfort, R., Rodríguez-Romero, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., López-Calahorra, F., Gómez-Puyou, A., Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**; 2002: 958-963.
46. Téllez-Valencia, A., Olivares-Illana, V., Hernández-Santoyo, A., Pérez-Montfort, R., Costas, M., Rodríguez-Romero, A., López-Calahorra, F., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that perturbs its dimer interface. *J. Mol. Biol.* **341**; 2004: 1355-1365.
47. Pérez-Montfort, R., Garza-Ramos, G., Alcántara, G. H., Reyes-Vivas, H., Gao, X. G., Maldonado, E., et. al. Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* **38**; 1999: 4114-4120.
48. Zomosa-Signoret, V., Aguirre-López, B., Hernández-Alcántara, G., Pérez-Montfort, R., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Crosstalk between the subunits of the homodimeric enzyme triosephosphate isomerase. *Proteins*. Apr 1; **67** (1). 2007; 75-83
49. Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R., Ferrin, T. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161**; 1982: 269-288.
50. Sirois, S., Wei, D. Q., Du, Q., Chou, K. C. Virtual screening for SARS-CoV protease based on KZ7088 pharmacophore points. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **44**; 2004: 1111-1122.
51. Verras, A., Kuntz, I. D., Ortiz de Montellano P. R. Computer-assisted design of selective imidazole inhibitors for cytochrome p450 enzymes. *J. Med. Chem.* **47**; 2004: 3572-3579.
52. Detering, C., Varani, G. Validation of automated docking programs for docking and database screening against RNA drug targets. *J. Med. Chem.* **47**, 2004: 4188-4201.

- 
- 53. Ragno, R., Mai, A., Massa, S., Cerbara, I., Valente, S., Bottoni, P., et al.** 3-(4-Aroyl-1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)-N-hydroxy-2-propenamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 3. Discovery of novel lead compounds through structure-based drug design and docking studies. *J. Med. Chem.* 47; 2004: 1351-1359.
- 54. Da Silva, C., Leiria, V., Carvalho, I., Taft, C.,** Molecular modeling, docking and ADMET studies applied to the design of a novel hybrid for treatment of Alzheimer's disease, *J. of Molecular Graphics and Modelling* 25; 2006: 169-175.