



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



**“INACTIVACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA DE LA
TRIOSAFOSFATO ISOMERASA DE *Leishmania mexicana*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA**

P R E S E N T A

LUPITA ARACELI ALVAREZ ESCAMILLA

PACHUCA DE SOTO, HGO., JUNIO 2008.

ÍNDICE GENERAL

PÁGINA

	RESUMEN	i
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	2
II.1	Leishmaniasis	2
II.2	Tipos de Leishmaniasis	2
II.2.1	Leishmaniasis Cutánea	2
II.2.2	Leishmaniasis Mucocutánea	4
II.2.3	Leishmaniasis Visceral	5
II.3	Ciclo de Vida del parásito	6
II.4	Leishmaniasis en México	7
II.5	Farmacoterapia	8
II.5.1	Antimoniales	8
II.5.2	Amfotericina B	9
II.5.3	Pentamidina	9
II.5.4	Otros	10
II.6	La triosafofato isomerasa (TIM) como blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios	12
II.7	Catálisis	13
II.8	Avances recientes en la búsqueda de guías para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos antileishmania	14
III.	JUSTIFICACIÓN	19
IV.	HIPÓTESIS	20
V.	OBJETIVO GENERAL	21
V.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21

VI.	METODOLOGÍA	22
VI.1	Enzimas	22
VI.2	Moléculas a ensayar	22
VI.3	Reactivos	22
VI.4	Actividad	23
VI.5	Determinación de la inactivación a 200µM	23
VI.6	Determinación de la I₅₀	24
VI.7	Sitio de unión	24
VI.8	Determinación por Docking del sitio de unión del compuesto en la enzima	25
VI.9	Selectividad en la TIM de humano	25
VII.	RESULTADOS	26
VII.1	Compuestos que inactivan a la triosafofato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i>	26
VII.2	Inactivación de la LmTIM por el compuesto 5	28
VII.3	Inactivación respecto al tiempo	29
VII.4	Efecto del compuesto 5 a diferentes concentraciones de LmTIM	31
VII.5	Efecto del compuesto 5 en la TIM de humano	32
VII.6	Acoplamiento del compuesto 5 en la interfase de la TIM	33
VIII.	DISCUSIÓN	36
IX.	CONCLUSIONES	39
X.	BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1.	Vector Género <i>Lutzomya</i> y <i>Phlebotomus</i>	2
Figura 2.	Leishmaniasis Cutánea	3
Figura 3.	Leishmaniasis Mucocutánea	4
Figura 4.	Leishmaniasis Visceral	5
Figura 5.	Ciclo de Vida de la Leishmania	6
Figura 6.	Estructura de los fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis	10
Figura 7.	Organización de la enzimas glucolíticas en el tripanosoma	11
Figura 8.	Estructura de la triosafosfato isomerasa	12
Figura 9.	Mecanismo de reacción de la triosafosfato isomerasa	13
Figura 10.	Efecto de diferentes concentraciones del compuesto 5 en la LmTIM	28
Figura 11.	Efecto del tiempo sobre la inactivación de la LmTIM a diferente concentración de compuesto	29
Figura 12.	Curva para la obtención de la K_{2app}	30
Figura 13.	Efecto del compuesto 5 a diferente concentración de LmTIM	31
Figura 14.	Efecto de diferentes concentraciones del compuesto 5 en la hTIM	32
Figura 15.	Sitio de Unión del compuesto 5 en la interfase de la LmTIM	33
Figura 16.	Puentes de hidrógeno entre el compuesto 5 y el dímero de la LmTIM	33
Figura 17.	Sitio de unión del compuesto 5 en la interfase de la hTIM	34
Figura 18.	Puentes de hidrógeno entre el compuesto 5 y el dímero de la hTIM	35

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1.	Casos de Leishmaniasis por año por entidad federativa. Estados Unidos Mexicanos 2000 - 2008	7
Tabla 2.	Fármacos actualmente utilizados para el tratamiento de leishmaniasis	15
Tabla 3.	Compuestos que inactivan la LmTIM	27
Tabla 4.	Residuos que se encuentran a menos de 5 Å del compuesto 5 en el dímero de la LmTIM	34
Tabla 5.	Residuos que se encuentran a menos de 5 Å del compuesto 5 en el dímero de la hTIM	35

ABREVIATURAS

Lm	<i>Leishmania mexicana</i>
LC	Leishmaniasis cutánea
LM	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
TIM	Triosafofato isomerasa
LmTIM	Triosafofato isomerasa de <i>Leishmania mexicana</i>
hTIM	Triosafofato isomerasa de humano
α GDH	α - glicerolfosfato deshidrogenasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
GAP	Gliceraldehido-3-fosfato
NADH	Dinucleotido de nicotinamina adenina reducido
NADH ⁺	Dinucleotido de nicotinamina adenina oxidado
Da	Daltones

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria crónica y zoonótica, con un patrón de transmisión predominantemente peridomiciliario o silvestre, ocasionada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, perteneciente a la familia de los tripanosomátidos; estos parásitos se encuentran presentes en reservorios animales salvajes y son transmisibles al hombre por vectores del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*. Los medicamentos de elección clásicamente han sido los antimoniales pentavalentes, la pentamidina y la amfotericina B. Sin embargo, la pérdida de eficacia, las dificultades para su administración, la aparición de resistencia y/o mala respuesta a estos compuestos y el incremento en la frecuencia y la severidad de las reacciones adversas hacen imperante el desarrollo de nuevos fármacos en contra de esta enfermedad. Un enfoque en la búsqueda de estos 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 enorme dependencia de la glucólisis como fuente de energía hace de las enzimas de esta ruta metabólica, blancos atractivos para el diseño de fármacos. Dentro de las enzimas glucolíticas varios investigadores han propuesto a la triosafosfato isomerasa la cual cataliza la interconversión de GAP y la DHAP; como blanco para el diseño de fármacos contra los tripanosomátidos. Por ello el presente proyecto tuvo como objetivo general, buscar la inactivación de la triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana*, por moléculas pequeñas. Se estudiaron 250 compuestos, cinco de ellos provocaron cierto grado de inactivación de la LmTIM. El efecto de los compuestos estudiados fue dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de enzima; esto último sugiere que los compuestos interfieren en la asociación de los monómeros de la LmTIM. La molécula más potente fue el compuesto 5 y la concentración que inactivo al 50% (I_{50}) la LmTIM fue $201\mu\text{M}$. Por lo tanto este compuesto puede servir como molécula guía para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos contra la leishmaniasis.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias se encuentran entre las enfermedades más comunes del ser humano. Se calcula que unos 350 millones de personas padecen infecciones por parásitos protozoarios. Los parásitos también infectan al ganado y ejercen un fuerte impacto económico en diferentes partes del mundo. En muchas de las parasitosis la batería actual de antiparasitarios no es efectiva. Además, empiezan a aparecer cepas de parásitos que son resistentes a fármacos previamente exitosos. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos fármacos en contra de enfermedades causadas por parásitos es imperativo.

La leishmaniasis es una enfermedad de amplia distribución geográfica en el mundo. Su incidencia ha aumentado en los últimos años, hasta en un 500%. Cifras reportadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), indican que existen más de 12 millones de personas infectadas en todo el mundo, con un incremento anual de dos millones y existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección. ^(1,2)

Es una enfermedad de alta prevalencia en muchas regiones áridas, tropicales y subtropicales del mundo, tales como el Este y Sureste de Asia, Oriente Medio, Norte y Este de África, el Sur de Europa (cuenca del Mediterráneo), América Central y Sudamérica. En América Latina, la leishmaniasis visceral está restringida a ciertas áreas y Brasil aporta más del 80% de los casos nuevos cada año. La forma cutánea está distribuida más ampliamente y en algunas regiones en donde la infección por esta especie es predominante, la posibilidad de invasión a mucosa o nasal está presente. En Colombia se reportaron para el 2004 cerca de 13,000 casos nuevos (99% de ellos cutáneos), lo que mantiene un gran incremento en la última década. ⁽³⁾

La distribución geográfica de la Leishmaniasis está limitada por la distribución del vector. El número de casos de Leishmaniasis está aumentando debido principalmente a los cambios del medio ambiente generados por el hombre, lo que aumenta la exposición humana al vector. ⁽²⁾

II. ANTECEDENTES

II.1 LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria zoonótica, producida por diferentes especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*. Es transmitida por insectos del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*, (pequeños dípteros llamados papalotillas) ⁽¹⁾ (Fig.1). Existen diversas especies de *Leishmania*, pero cuatro parasitan al hombre: *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. tropica*. ⁽⁴⁾ Estas enfermedades se caracterizan por comprometer la piel, mucosas y vísceras.



Figura. 1 VECTOR. Género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*

II.2 TIPOS DE LEISHMANIASIS

Las infecciones por *Leishmania* suelen presentar tres síndromes principales que dependen de la especie en juego y de la respuesta inmunitaria del huésped.

II.2.1 Leishmaniasis Cutánea (LC):

La aparición de las lesiones cutáneas algunas veces se encuentra asociada con la picadura del insecto vector en sujetos que viven en áreas endémicas, estos penetran y permanecen en el nicho ecológico por breves días, y luego desencadenan la enfermedad. En promedio, se puede hablar de un periodo, de incubación entre 2 y 3 semanas.

Después de este tiempo aparece una pequeña lesión inicial frecuentemente visible, pero no siempre, el aspecto típico de la lesión inicial es un leve enrojecimiento circunscrito, frecuentemente pruriginoso, seguido, a los pocos días, por una leve infiltración papulosa de unos 3mm de diámetro y con mucha frecuencia con una o dos diminutas vesículas. Después de varios días, la lesión se ulcera espontáneamente y se cubre de un exudado amarillento y adherente, que dará lugar a la costra. La úlcera de la leishmaniasis es redondeada, indolora, con bordes bien definidos levantados y cortados.⁽¹⁾ (Fig. 2)

La localización de la úlcera es más frecuente en las partes expuestas del cuerpo, especialmente extremidades y cara. En los primeros meses de evolución, la úlcera tiende a crecer hasta un tamaño máximo que está en función de la respuesta inmune del huésped y de la especie de *Leishmania* infectante. Con frecuencia son afectados los ganglios linfáticos y se producen linfangitis y linfadenitis regionales, las lesiones se estabilizan y a medida que empieza a prevalecer la respuesta inmune del huésped, la enfermedad tiende a evolucionar a la curación espontánea, en un periodo de 6 meses a 3 años.⁽¹⁾



Figura. 2 Leishmaniasis Cutánea. Lesiones de la leishmaniasis cutánea caracterizada principalmente por úlceras redondeadas, indoloras, con bordes bien definidos.⁽¹⁾

II.2.2 Leishmaniasis Mucocutánea (LM):

Resultante de la aparición de lesiones metastásicas en mucosas, sobre todo a nivel de orofaringe. Las manifestaciones clínicas de la forma Mucocutánea se presenta muchos meses o años después de haber cicatrizado la forma cutánea; ocasionalmente aparecen cuando todavía existen las manifestaciones en la piel o bien las manifestaciones en mucosas son primarias, sin antecedente de lesión cutánea. ⁽¹⁾

La lesión primero envuelve a la mucosa nasal la cual se extiende a orofaringe y laringe, al inicio sólo se aprecia una discreta secreción de moco, como si el enfermo tuviera una rinitis o un resfriado. Luego, se produce la inflamación de la mucosa, que se vuelve eritematosa, edematosa y dolorosa. (Fig. 3)

La leishmaniasis Mucocutánea, en los primeros años de evolución, no afecta el estado general del paciente, el que puede realiza su labor normalmente, Sin embargo, cuando las lesiones en mucosas están muy avanzadas y comprometen la mucosa de la boca y laringe, la respiración, la alimentación y el estado general del enfermo se altera. ⁽¹⁾



Figura. 3 Leishmaniasis Mucocutánea. Lesiones metastásicas a nivel orofaringe de la leishmaniasis mucocutánea. ⁽¹⁾

II.2.3 Leishmaniasis Visceral (LV):

La leishmaniasis visceral es una enfermedad parasitaria sistémica que compromete la vida. Después de la picadura del vector, existe un periodo de incubación que varía de 4 a 10 meses. Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral típica están asociadas con fiebre, la que siempre es progresiva y elevada, remitente o intermitente, que dura semanas y se alterna con periodos afebriles que también duran semanas. Posteriormente, la fiebre se torna persistente y ondulante. Existe progresivo deterioro del huésped, palidez, hepatoesplenomegalia. En la fase crónica, la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa iliaca derecha, con un abultamiento considerable del abdomen. (Fig. 4) Existe una linfadenopatía generalizada, en especial de los ganglios mesentéricos, epistaxis, hemorragia gingival, edema y ascitis. Los hallazgos de laboratorio incluyen anemia normocítica normocrómica, neutropenia, pancitopenia, leucopenia, trombocitopenia e hipoalbuminemia. ^(1,4)

Este tipo de leishmaniasis es fatal si no es tratada correctamente; 4 de cada 5 pacientes muere antes o al comienzo del tratamiento y mueren por falla cardíaca, falla hepática o sangrado Gastrointestinal.



Figura. 4. Leishmaniasis Visceral. Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se presentan a nivel sistémico, caracterizada principalmente por esplenomegalia. ⁽¹⁾

II.3 CICLO DE VIDA DEL PARASITO.

La leishmania es un protozoo, que pertenece a los *Tripanosomátidos*, su ciclo de vida incluye dos etapas morfológicas, promastigoto y amastigoto. Cuando un mosquito hembra chupa sangre de un huésped infectado, inyecta promastigotos metacíclicos los cuales son rápidamente fagocitados por los macrófagos o las células de Langerhans en la piel, los promastigotos fagocitados son envueltos en un fagosoma en la célula huésped y se transforman en amastigotos. Estos se replican por fisión binaria hasta que se rompen las células infectadas y se liberan. Nuevamente son fagocitados por otros macrófagos en la piel u órganos viscerales donde continúan dividiéndose, el ciclo continúa hasta que la infección se establece. Cuando la hembra del mosquito se alimenta de sangre ingiere amastigotos, los cuales son liberados dentro del intestino medio. Durante los siguientes días, el amastigoto se convierte en la etapa no infectiva (promastigoto) y se replica por fisión binaria; el parásito se encuentra en la etapa metacíclica altamente infecciosa, en la cual se mueve a la faringe y a la probóscide del mosquito, donde los transmite durante su siguiente ingesta de sangre. ⁽²⁾ (Fig. 5)



Figura. 5. Ciclo de vida de la Leishmania. Tomado de la página de la Organización Mundial de la Salud (www.who.org).

II.4 Leishmaniasis en México

En nuestro país se presenta un tipo particular de leishmaniasis cutánea conocida como “úlceras de los chicleros”, ya que tradicionalmente afectaba a hombres que laboraban en regiones selváticas en las cosechas de chicle y es causada por *L. mexicana*. La distribución geográfica en el país es amplia y afecta por lo menos a 17 estados. Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas en el Norte, algunos estados del Pacífico y el centro, así como todos los estados del Sureste. Sin embargo, se ha observado una modificación en la población en riesgo por la migración de grupos hacia regiones deforestadas, con lo cual el mosquito habita ahora en el entorno domiciliario.⁽⁵⁾

En México, la legislación no considera la enfermedad como un trastorno de notificación obligatoria, por lo cual el registro nacional es una subestimación, sin embargo, la situación es preocupante por su amplia distribución en el territorio nacional; de lo que históricamente era una enfermedad de chicleros, en los años del 2000 al 2008 se reportaron casos en 13 estados con presencia regular en 8 de ellos, tan al norte como Nayarit y Sinaloa en el Océano Pacífico; en el Golfo de México se distribuyen desde Veracruz, Tabasco y Campeche, Oaxaca y Chiapas en el Pacífico Sur y en el Caribe mexicano Quintana Roo.^(6,7) (Tabla1)

Tabla 1. Casos de Leishmaniasis por año por entidad federativa. Estados Unidos mexicanos 2000-2008.

ENTIDAD	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008 (Hasta el 6 de abril)
Baja California Sur	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Campeche	72	68	282	149	100	100	66	11	21
Chiapas	20	0	100	125	44	108	65	13	3
Distrito Federal	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Jalisco	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Nayarit	49	625	30	19	38	21	23	1	5
Oaxaca	62	0	0	0	0	0	0	0	0
Puebla	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Quintana Roo	356	314	303	400	186	182	321	110	40
Sinaloa	14	5	9	25	1	1	9	1	3
Tabasco	103	202	485	384	483	483	247	95	11
Veracruz	10	5	18	22	16	17	88	8	5
Yucatán	0	0	0	4	0	0	1	1	0
TOTAL	686	1219	1228	1129	869	868	820	241	88

FUENTE: Sistema Único de Información para la Vigencia Epidemiológica. DGE/SSA. Tomado de la página de la Dirección General de Epidemiología. (www.dgepi.salud.gob.mx)

II.5 FARMACOTERAPIA

En 1912 se trató en Brasil el primer caso de leishmaniasis cutánea con un antiemético antimonial trivalente. A partir de 1920 se dispuso de antimoniales pentavalentes y en la década de los 40 entran en el mercado farmacéutico los antimoniales pentavalentes, el estibogluconato de sodio (Repodral®/Pentostan®) y N-metilglucamina (Glucantime®).

Los esquemas de tratamiento se aplican de acuerdo a la forma clínica de leishmaniasis. Se manejan dos líneas básicas de tratamiento: primera línea con antimoniales pentavalentes y segunda línea con amfotericina B. ⁽⁸⁾

II.5.1 Antimoniales

Existen dos sales de antimoniales pentavalentes disponibles: antimoniato de meglumina y el estibogluconato de sodio (Fig. 6). Ambos medicamentos son similares en eficacia y toxicidad. Sus mecanismos de acción no son bien conocidos, aunque ellos pueden inhibir la glucólisis y oxidación de los ácidos grasos de la leishmania.

La Organización Mundial de la Salud para un tratamiento satisfactorio recomendaba emplear 20 mg/kg/día de estibogluconato sódico vía Intramuscular o Intravenosa, con una dosis máxima de 850 mg durante 20 días o hasta 2 semanas después de la eliminación del parásito. En la actualidad no se aconseja limitar la dosis máxima, ya que la respuesta es superior a mayores dosis y duración del tratamiento. ⁽²⁾

Una desventaja en el tratamiento con antimoniales son sus Reacciones Adversas las cuales incluyen: dolor abdominal, náuseas, vómitos, malestar general, cefalea, debilidad, mialgias, artralgias, fiebre o exantema. Con dosis acumuladas elevadas se observan frecuentemente alteraciones electrocardiográficas: aplanamiento o inversión de la onda T, prolongación del segmento QT o elevación del segmento ST. Un segmento QT corregido superior a 0.5 segundos ó un ST elevado obliga a interrumpir el tratamiento, con lo que desaparecen estos cambios electrocardiográficos.

Durante el tratamiento también puede aparecer elevación de las enzimas hepatocelulares y pancreáticas, con o sin pancreatitis; por consiguiente, la miocarditis, la hepatitis y la pancreatitis contraindican de forma relativa el uso de antimoniales. ^(8,3)

II.5.2 Amfotericina B

Es un antibiótico altamente lipofílico que actúa sobre los esteroides y fosfolípidos de las membranas celulares; se emplea como medicamento de segunda línea en el tratamiento de leishmaniasis resistente a los antimoniales (fig. 6). Se comienza con una dosis de 0.5 mg/kg/día y se aumenta gradualmente hasta 1.5 mg/kg/día en días alternos por 15 días. Las reacciones adversas son variadas, principalmente a nivel renal, anemia y convulsiones. Se presenta fiebre, anorexia, náuseas, vómitos y flebitis.

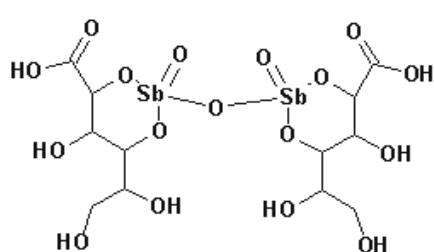
La amfotericina B produce una hipopotasemia importante que puede agravar y contribuir al desarrollo de insuficiencia cardíaca, está contraindicada en gestantes, cardiopatías, neuropatías y hepatopatías. ⁽⁸⁾

II.5.3 Pentamidina

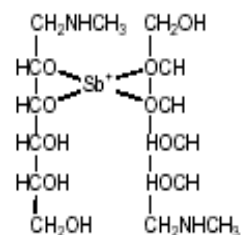
Es una diamina con un amplio espectro de actividad antiparasitaria (fig. 6). Eficaz contra la leishmaniasis, tripanosomiasis y pneumocitosis. En la leishmaniasis actúa inhibiendo la replicación del cinetoplasto. Tiene alta afinidad por las proteínas tisulares, se acumulan en el hígado, riñones, glándulas suprarrenales y bazo. La pentamidina es usada como un medicamento alternativo en los casos en que no responden a los antimoniales pentavalentes. La dosis recomendada es de 2 a 4 mg/kg/día vía Intramuscular cada 3 a 4 días por 15 dosis. Las reacciones adversas más frecuentes son dolor, vómitos, discrasia sanguínea, lipotimias, síncope, hipotensión y puede causar diabetes. ⁽¹⁾

II.5.4 Otros

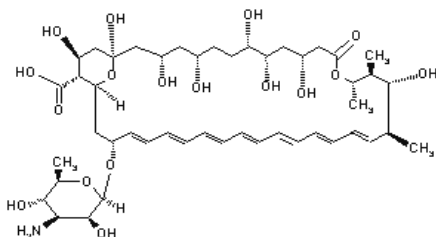
Recientemente se ha utilizado la azitromicina para el tratamiento de la leishmaniasis en mucosa; sin embargo, se desconoce cómo actúa dicho fármaco en el parásito. ⁽⁹⁾ Por otro lado, la miltefosina, un análogo de fosfocolina originalmente desarrollado para el cáncer, se ha ocupado para el tratamiento de leishmaniasis cutánea ⁽¹⁰⁾ y visceral; ⁽¹¹⁾ sin embargo, causa severos problemas gastrointestinales. ⁽¹²⁾



estibogluconato de sodio



antimoniato de meglumina



anfotericina B



pentamidina

Figura. 6 Estructura de los fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis.

Actualmente se puede afirmar que no existe un medicamento contra la leishmaniasis del todo eficaz e inocuo para el paciente, dado que los administrados hasta el momento no son por completo eficaces en todas las fases de la enfermedad o producen graves reacciones adversas o ambas cosas. Por lo tanto, dado lo limitado y problemático de la farmacología de esta enfermedad es claro que existe una necesidad urgente 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 enorme 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 (Fig. 7).

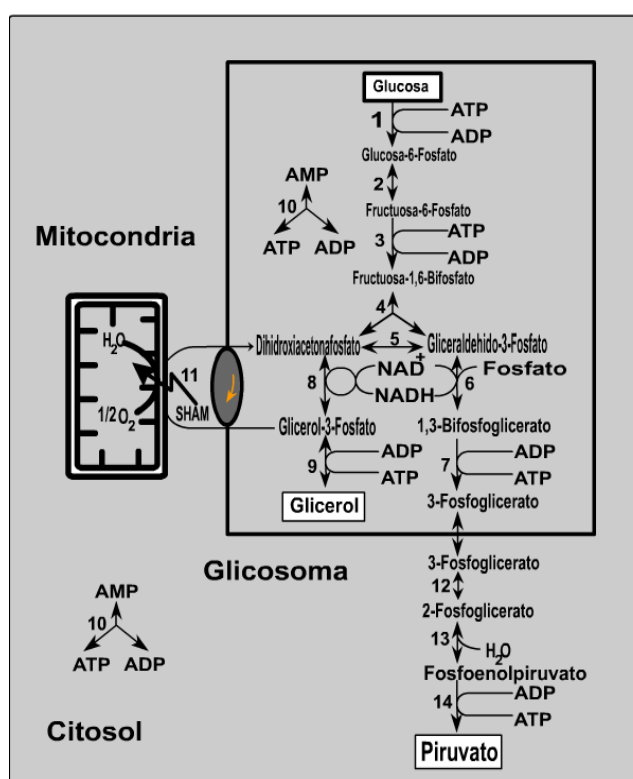


Figura 7. Organización de las enzimas glucolíticas en el tripanosoma.

1. Hexocinasa, 2. Hexosa fosfato isomerasa, 3. Fosfofructocinasa, 4. Fructosa-1,6,-bifosfato aldolasa 5. Triosa fosfato isomerasa, 6. Gliceraldehído-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⁺** nicotinamin adenin dinucleótido oxidado, **NADH** nicotinamin adenin dinucleótido reducido. Tomado de Oppendoes et al., 2001.

II.6 La triosafosfato isomerasa (TIM) como el blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios

Dentro de las enzimas glucolíticas varios investigadores han propuesto a la TIM como blanco para el diseño de fármacos contra los tripanosomátidos. ^(13, 14, 15)

La TIM es una enzima homodimérica, que cataliza la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato (GAP) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), cada monómero está formado por unos 250 residuos de aminoácidos.

La interfase entre los dos monómeros es relativamente grande, aproximadamente 1400 Å. 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) (Fig. 8). Se conoce la secuencia de aminoácidos de la TIM de aproximadamente 180 especies y la estructura tridimensional de la TIM de pollo,⁽¹⁶⁾ levadura,⁽¹⁷⁾ *Trypanosoma brucei*,⁽¹⁸⁾ *Escherichia coli*,⁽¹⁹⁾ humano,⁽²⁰⁾ *Bacillus stearothermophilus*,⁽²¹⁾ *Plasmodium falciparum*,⁽¹⁵⁾ *Vibrio marinus*,⁽²²⁾ *Trypanosoma cruzi*,⁽²³⁾ *Leishmania mexicana*,⁽²⁴⁾ *Thermotoga marítima*,⁽²⁵⁾ *Pyrococcus woesei*,⁽²⁶⁾ *Entamoeba histolytica*,⁽²⁷⁾ *Caenorhabditis elegans*,⁽²⁸⁾ *Thermoproteus tenax* ⁽²⁹⁾ y *Methanocaldococcus jannaschii*. ⁽³⁰⁾

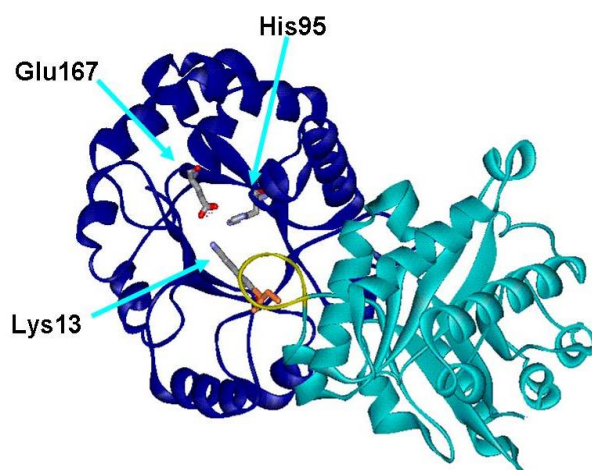


Figura 8. Estructura de la triosafosfato isomerasa. Los monómeros A y B se muestran en color azul marino y azul claro respectivamente. La Cys14 del monómero A se muestra en naranja y el asa 3 del monómero B en amarillo. También se muestran los residuos catalíticos del monómero A. ⁽²⁴⁾

II.7 Catálisis

El mecanismo por el cual la TIM cataliza la interconversión entre GAP y la DHAP (Fig. 9) se ha establecido mediante técnicas bioquímicas ⁽³¹⁾, cristalografía de proteínas, ⁽³²⁾ resonancia magnética nuclear ⁽³³⁾ y mecánica cuántica. ⁽³⁴⁾

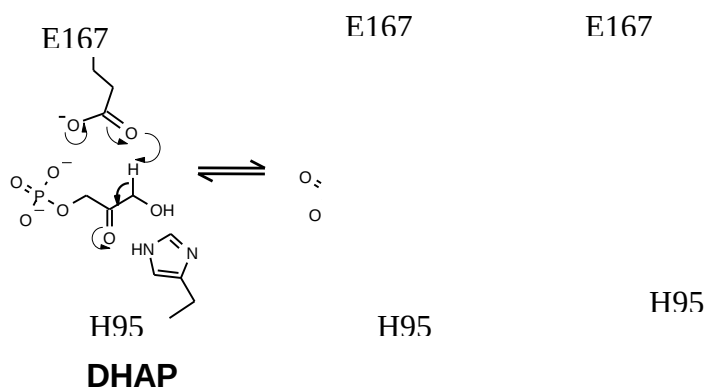


Figura. 9. Mecanismo de Reacción de

En la reacción de isomerización no enzimática con bases orgánicas como catalizadores, se demostró que la eliminación de un protón del sustrato forma un intermediario enodiolato. La formación de este intermediario conduce a una reacción de ω -eliminación en la cual se forma metilglioxal y fosfato inorgánico.

En el caso de la reacción enzimática, la TIM cataliza la isomerización de un intermediario enediol, en un proceso en que la producción de metilglioxal es muy limitada. El metilglioxal que se logra producir está a una concentración inferior a sus niveles tóxicos. ⁽¹⁷⁾

Los valores de la eficiencia catalítica para las reacciones de isomerización y eliminación son de 10^6 a $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y 2 a $14 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. ⁽³⁵⁾

Como la reacción enzimática es de 10^9 a 10^{10} veces más rápida que la reacción no catalizada ⁽³⁶⁾ y su velocidad catalítica está limitada por la difusión, a la TIM se le considera un catalizador perfecto. ⁽³¹⁾

El sitio activo de la TIM se encuentra localizado al centro del barril y cada monómero tiene uno. Tres son los residuos que participan directamente en la reacción de isomerización. Siguiendo la numeración de la LmTIM éstos son el Glutámico 167 (Glu167), Histidina 95 (His95) y Lisina 13 (Lys13). En el sentido de DHAP a GAP, el carboxilo del Glu167 actúa como electrófilo polarizando el grupo carbonilo del sustrato, dando lugar a la reacción de enolización. La Lys13 es el residuo que confiere la especificidad por el sustrato. ⁽³⁷⁾

II.8 Avances recientes en la búsqueda de guías para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos antileishmania.

La quimioterapia actualmente disponible para la leishmaniasis está lejos de ser satisfactoria debido a la resistencia a los antimoniales pentavalentes, los cuales han sido recomendados para el tratamiento de leishmaniasis visceral y cutánea por más de 50 años. Si bien en los últimos años nuevos fármacos están disponibles para el tratamiento de la LV, incluyendo una excelente pero altamente cara formulación liposomal de la amfotericina B y la miltefosina oral, así como formulación parenteral y tópica de la paromicina que ofrece tratamientos potenciales para LV y LC respectivamente, así también se ha recurrido a fármacos que aún se encuentran sometidos a estudios preclínicos y que han demostrado ser eficaces. (Tabla 2)

La búsqueda de nuevos fármacos continúa; algunos blancos potenciales han sido identificados en estudios moleculares y bioquímicos y algunos han sido ya validados; sin embargo, aún las pruebas para explotarlos esta en progreso. ⁽³⁸⁾

Tabla 2. Fármacos actualmente utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis. (Tomado de Croft et al., 2006)
--

Leishmaniasis visceral

Fármacos de primera Elección	estibogluconato de sodio, antimonio de meglumina amfotericina B amfotericina B liposomal pentamidina
Estudios clínicos	miltefosina (oral, fase IV; registrado en la India) paromicina (fase III) sitamaquina (oral, fase II) otras formulaciones de la amfotericina B

Leishmaniasis cutánea

Fármacos de primera elección	estibogluconato de sodio, antimonio de meglumina amfotericina B pentamidina paromicina (formulación tópica con urea)
Estudios clínicos	miltefosina (oral, fase III, registrado en Colombia) paromicina (formulación tópica con gentamicina o surfactantes, fase II) algunos antifúngicos como el ketoconazol, fluconazol, itraconazol

Varios blancos moleculares en los tripanosomátidos han sido sugeridos incluyendo el metabolismo de lípidos, transducción de señales, inducción de la apoptosis, como también la inhibición de enzimas en *Leishmania mexicana*. La búsqueda propone identificar y validar nuevos blancos en respecto a una mayor especificidad sobre leishmania para el desarrollo de fármacos. Aunque estudios comparativos entre leishmania y tripanosomas han sido un buen arranque para desear encontrar un fármaco antitripanosomátido de amplio espectro. ⁽³⁹⁾ Si bien la ambición por desarrollar un fármaco o una formulación eficaz contra todas las formas de leishmaniasis es poco prometedora a cumplirse, no obstante los avances han sido significativos como real es ahora el concepto de un tratamiento de primera elección. ^(38,39)

Desafortunadamente la línea del descubrimiento de fármacos contra la leishmaniasis está en desequilibrio, como algunas áreas en la búsqueda de fármacos, las herramientas y las técnicas disponibles para el progreso de estos compuestos a través de la optimización de los mismos, así como las etapas preclínicas están limitadas. Por ello, todos los esfuerzos para encontrar nuevos compuestos, las fuentes disponibles son un punto esencial y crucial para el desarrollo de nuevos fármacos.

Una línea de investigación son los productos naturales los cuales continúan siendo una fuente muy importante de agentes quimioterapéuticos, particularmente empleados para tratar enfermedades infecciosas, por esta razón numerosos metabolitos derivados de productos naturales de diferentes clases estructurales han sido investigados como candidatos a fármacos antileishmaniasis y antitripanosomiasis. Dada la utilidad de los productos naturales en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, no es sorprendente que algunos compuestos derivados de plantas muestren actividad antileishmania.⁽⁴⁰⁾

En la literatura se reportan varias investigaciones alrededor de los productos naturales como guías para el desarrollo de nuevos fármacos mostrando resultados favorables, algunos de los metabolitos con actividad contra distintas cepas de leishmania que se han reportado incluyen los compuestos fenólicos como el compuesto 2',6'-Dihidroxi-4'-metoxichalcona obtenido de la planta Piperaceae, que mostró actividad contra promastigotos de *L. amazonensis*, con una IC₅₀ de 0.5µg/mL y con una IC₅₀ de 24µg/mL contra amastigotos intracelulares, algunos derivados de los flavonoides como la luteolina y la quercetina mostraron actividad antileishmania cuando se ensayaron de manera in vitro contra promastigotos de *L. donovani*, con valores en la IC₅₀ de 12.5 y 45.5µM respectivamente, induciendo cambios morfológicos y pérdida en la integridad celular en los promastigotos. También una serie de 27 taninos hidrolizables fueron investigados por su actividad antileishmania, todos los compuestos exhibieron una potente actividad contra la forma intracelular amastigota con valores de IC₅₀ desde 0.4 - 12.5µg/mL.

En contraste, ninguno de los compuestos fue significativamente tóxico para la forma promastigota del parásito, y muchos de los compuestos no fueron tóxicos para las células huésped en mamíferos ($IC_{50} > 25 \mu g/mL$). Así mismo, dos peróxidos cíclicos aislados de la esponja Palauan *Plakortis* aff. *Angulospiculatus* mostró potente actividad contra promastigotos de *L. mexicana*, el peróxido más potente (160, $LD_{50} 0.29 \mu g/mL$) causó lisis en la membrana celular del parásito después de 24 hrs. a $1 \mu g/mL$ y un fuerte decremento en la motilidad del parásito entre los 30 min. ⁽⁴⁰⁾

Dada la tremenda diversidad química presente en los productos naturales y la actividad prometedora que se ha demostrado alrededor de los parásitos, el desarrollo de productos naturales antiparasitarios o de sus análogos, conforme a las consideraciones generales podría tener un impacto positivo sobre el tratamiento de la leishmaniasis.

Por otro lado, otra línea de investigación para encontrar sistemas terapéuticos más eficaces y menos tóxicos para tratar esta enfermedad parasitaria, es la inmunoquimitoterapia para tratar la leishmaniasis cutánea. El uso de la inmunoterapia en el tratamiento de la leishmaniasis fue descrito por primera vez a comienzos del siglo XX, cuando Row trató con éxito a tres pacientes con botón de oriente con una vacuna preparada a partir de promastigotos atenuados por calor. La vacuna experimental usada por Mayrink, en Brasil se empleó por primera vez como fármaco terapéutico en 1981, cuando dos pacientes con leishmaniasis mucocutánea fueron resistentes al tratamiento con antimonio de meglumina, ambos pacientes se curaron clínicamente con inmunoterapia sola y no desarrollaron reacciones adversas. Después se llevaron a cabo otros dos estudios con la vacuna sola, se consiguió una tasa de curación del 76% cuando la vacuna se administró por vía intramuscular y del 95% cuando se administró por vía subcutánea; sin embargo, hasta el momento la cura fue considerablemente mayor que con los compuestos de antimonio. ⁽⁴¹⁾

Estos estudios; sin embargo, demostraron que la inmunoterapia puede ser un método alternativo de tratamiento cuando no se pueden usar compuestos de antimonio o cuando el paciente es resistente a ellos, finalmente se realizó un estudio abierto demostrando que la combinación de la vacuna de una sola cepa de *Leishmania amazonensis* con una dosis reducida de compuestos de antimonio es muy eficaz en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea: el 100% de los pacientes se curaron con 4 ciclos de tratamiento. ⁽⁴¹⁾ Con estos resultados podría considerarse la importancia de la inmunoterapia respecto al estado socioeconómico de las víctimas de leishmaniasis, puesto que la mayoría de los pacientes son pobres y, generalmente, viven en áreas rurales remotas, lejos de centros médicos donde se administra el tratamiento.

Finalmente las enfermedades parasitarias son una amenaza silenciosa para la humanidad. La falta de quimioterapia, el alarmante decremento en el arsenal de eficaces fármacos antiparasitarios, así como la resistencia a ellos, hacen gran énfasis en la necesidad de nuevos agentes profilácticos y terapéuticos para el tratamiento de la leishmaniasis.

III. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad crónica y zoonótica, con un patrón de transmisión predominantemente peridomiciliario o silvestre, ocasionada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, presentes en reservorios animales salvajes y transmisibles al hombre por vectores del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*. Datos reportados por la OMS, indican que constituye la segunda endemia de tipo tropical y la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles, luego de la Malaria y la Tuberculosis, así como el cuarto lugar entre las patologías que producen impacto negativo, según los años ajustados a discapacidad. Actualmente afecta a 12 millones de personas en 88 países. La mayoría de casos está en países en vías de desarrollo, especialmente en las comunidades más pobres.

En México la enfermedad se distribuye al menos en 20 estados, además la legislación no considera la leishmaniasis como un trastorno de notificación obligatoria, por lo cual el registro nacional es una subestimación, no obstante se han presentado alrededor de 400 nuevos casos por año.

Los medicamentos de elección clásicamente han sido los antimoniales pentavalentes, la pentamidina y la amfotericina B. Sin embargo, la pérdida de eficacia, las dificultades para su administración, la aparición de resistencia y/o mala respuesta a estos compuestos y el incremento en la frecuencia y la severidad de las reacciones adversas hace imperante la búsqueda de moléculas capaces de inactivar alguna enzima clave en el metabolismo del parásito, las cuales puedan servir como guía en la obtención de nuevos medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad.

IV. HIPOTÉISIS

La triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana* puede ser inactivada por la unión de moléculas pequeñas a la misma.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar moléculas pequeñas que se unan a la triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana*, las cuales provoquen su inactivación.

V.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar el porcentaje de inactivación de la LmTIM, por moléculas pequeñas a una concentración de 200µM.
- 2.- Seleccionar las 5 moléculas con mayor capacidad de inactivación y determinar la concentración que logra el 50% de inactivación (I₅₀).
- 3.- Establecer el posible sitio de unión de las moléculas en la enzima.
- 4.- Determinar la selectividad de la molécula más activa en la LmTIM respecto de la TIM de humano.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Enzimas. Tanto la TIM de *L. mexicana* así como la de humano fueron recombinantes. Estas enzimas ya purificadas fueron proporcionadas por el laboratorio de Bioquímica del Dr. Armando Gómez Puyou del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

VI.2 Moléculas a ensayar. Se estudió la librería de moléculas pequeñas con las que se cuenta en nuestro laboratorio, las cuales fueron 250 moléculas. Para probar su efecto a una concentración de 200 μ M, en las condiciones descritas abajo. Se seleccionaron las moléculas con mayor capacidad de inactivación, para reducir el número a cinco moléculas, con las cuales se llevó a cabo un estudio más detallado de las mismas.

Todas lo moléculas ensayadas cumplieron con las reglas de Lipinski ⁽⁴²⁾, 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⁺ y no más de 10 aceptores de H⁺. Todas las moléculas fueron de origen sintético con diversa estructura química, algunas de ellas adquiridas de la compañía Tripos, y otras sintetizadas por el laboratorio del Dr. Rafael Castillo en la Facultad de Química de la UNAM.

VI.3 Reactivos. Todo el stock de reactivos utilizados fueron comprados de la compañía Sigma-Aldrich, con un grado de pureza mayor de 95%.

Preparación del sustrato. La presentación utilizada del Gliceraldehído-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 mín, 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 mín 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 el pH 5 agregando pizcas de bicarbonato de sodio.

VI.4 Actividad. La actividad de ambas TIMs se midió en un espectrofotómetro de arreglo de diodos, marca Agilent modelo 8453. Mediante un sistema acoplado utilizando α -glicerol fosfato deshidrogenasa (α -GDH), en dirección de la reacción de GAP a DHAP a 25 °C en 1 ml de medio a pH 7.4, con 100 mM de trietanolamina, 10 mM de ácido etilendiamintetracético (EDTA), 0.2 mM de dinucleotido de nicotinamina adenina reducido (NADH), 0.9 unidades de α -GDH, y 1 mM de GAP. La reacción se inició con la TIM, generalmente 5 ng. La α -GDH redujo la DHAP producida por la TIM a glicerol-3-fosfato utilizando NADH que se oxido a NAD⁺.

El NADH absorbió a 340 nm, el decremento en absorbancia a 340 nm respecto al tiempo se utilizó para calcular la actividad de la TIM.

La actividad de la enzima se calculó con la siguiente ecuación:

Ecuación 1.

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

ΔOD = cambio de absorbancia por minuto

V = volumen de la celda en mL.

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH a 340nm que es 6.22.

VI. 5 Determinación de la inactivación a 200 μ M.

Para llevar a cabo el barrido de todos los compuestos a estudiar, se escogió ensayar su efecto a una concentración de 200 μ M, esto fue con base en estudios previos realizados en la TIM de *Trypanosoma cruzi*.⁽⁴³⁾

La TIM de *Leishmania mexicana* se incubó a una concentración de 5 μ g/ml en trietanolamina 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.4, en presencia o ausencia de cada una de las moléculas a una concentración de 200 μ M. La incubación se llevó a cabo a 36 °C por 2 horas. Al término, se tomó una alícuota de 1 μ L para medir su actividad.

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

Ecuación 2.

$$\% \text{ actividad} = \frac{\text{actividad de la enzima en presencia de la molécula}}{\text{actividad de la enzima en ausencia de la molécula}} * 100$$

VI.6 Determinación de la I_{50} .

De las 250 moléculas ensayadas se seleccionaron las 5 moléculas con mayor porcentaje de inactivación, con las cuales se realizó un estudio más detallado de las mismas, realizándose cada experimento por triplicado. Parte de esto fue el cálculo de la I_{50} lo cual se realizó mediante el ajuste de curvas de concentración del compuesto a la ecuación 3. ⁽⁴⁴⁾

Ecuación 3.

$$V_i = (V_o \times I_{50}^n) / (I_{50}^n + I^n)$$

Donde V_i indica la actividad a la concentración dada de la molécula, V_o es la actividad inicial, I_{50} la concentración de la molécula que induce el 50% de inactivación, I la concentración de la molécula ensayada, y n es el número de Hill.

VI.7 Sitio de unión

Para la determinación del sitio de unión hubo dos posibilidades, la primera de ellas es que la molécula pequeña se uniera en la interfase del dímero, la segunda es que reconociera algún sitio en el monómero. Para poder establecer cuál de estas 2 opciones era la correcta, se realizaron ensayos de inactivación a una concentración fija de molécula y a diferente concentración de la enzima. La idea que subyace en esta metodología es que al ser una enzima homodimérica, la constante de disociación entre monómero y dímero depende de la concentración de proteína, es decir, si la molécula se unía a la interfase del dímero el porcentaje de inactivación estaría afectado por la concentración de proteína. Caso contrario indicaba que la molécula se estaba uniendo al monómero.

VI.8 Determinación por Docking del Sitio de unión del compuesto en la enzima.

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. La determinación del modo de unión del compuesto 5 en la interfase de la LmTIM se llevo a cabo con el programa computacional MOE (www.chemcomp.com).

VI.9 Selectividad en la TIM de humano

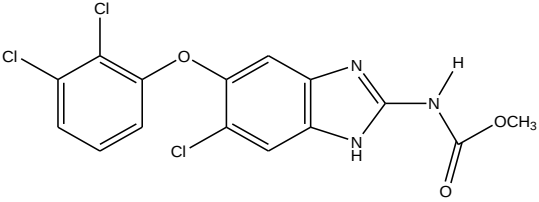
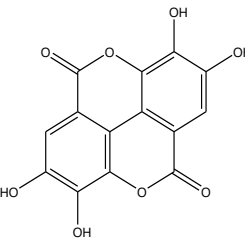
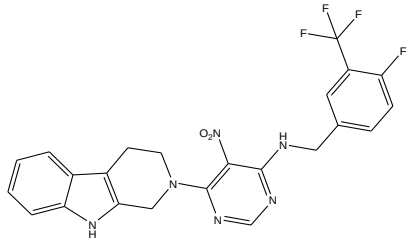
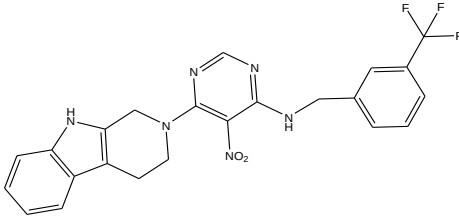
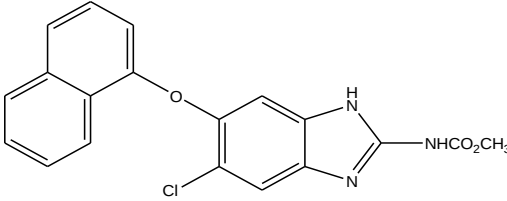
Un punto importante dentro del estudio de estas moléculas, fue saber si sólo son capaces de inactivar a la enzima del parásito y no tener efecto en la enzima del humano. Por lo cual se realizaron ensayos de inactivación en la TIM de humano bajo las condiciones descritas para la enzima del parásito.

VII. RESULTADOS

VII.1 Compuestos que inactivan a la triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana*.

En la búsqueda de compuestos que inactiven a la LmTIM, se ensayaron 250 compuestos a concentración de 200 μ M y se calculó la media de los datos para el grafico de los resultados. Los resultados mostraron que el grado de inactivación depende de la estructura del compuesto. Por ejemplo, los compuestos 1 y 2 causaron una ligera inactivación. Los compuestos 3 y 4, ocasionaron una mayor inactivación de la enzima y el compuesto 5 (metil 5-cloro-6-(naftalen-1-iloxi)-1H-benzo[d]imidazol-2-ilcarbamato) logró inactivar la actividad de la enzima en un 50%. (Tabla 3).

Tabla 3. Compuestos que inactivan la LmTIM.

No. De Compuesto	Estructura	% Inactivación
1		20
2		22
3		35
4		35
5		50

Los compuestos se incubaron a una concentración de 200µM. Las condiciones se describen en la metodología.

De acuerdo con la tabla 3 los compuestos 3 y 4 presentaron una inactivación considerable de la LmTIM; sin embargo, debido a problemas de solubilidad, no se logró hacer un estudio más detallado sobre el mecanismo de acción de estos compuestos en dicha enzima. No obstante que el compuesto 5 también presentó problemas de solubilidad sí fue posible llevar a cabo varios estudios con este compuesto. De los 245 compuestos restantes no se realizaron ensayos más detallados, debido a que no inactivaron más del 5% a la enzima, por lo que en la tabla 3 se muestran sólo los compuestos con un porcentaje de inactivación de la LmTIM mayor del 20%.

VII.2 Inactivación de la LmTIM por el compuesto 5.

Lo primero que se hizo fue calcular la concentración del compuesto a la cual la enzima pierde el 50% de su actividad (I_{50}). Esto se logró mediante una curva de concentración del compuesto. (Figura 10).

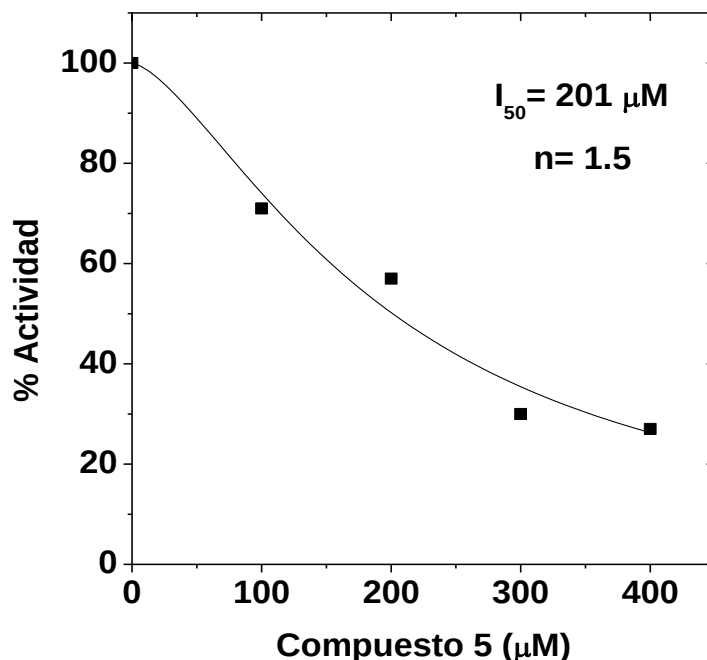


Figura 10. Efecto de diferentes concentraciones del compuesto 5 en la LmTIM. Las condiciones experimentales se describen en la metodología.

El ajuste de la curva a la ecuación 1, dio como resultado una I_{50} de 201 μM y un valor de la constante de Hill de 1.5.

VII.3 Inactivación respecto al tiempo.

La inactivación de la LmTIM por el compuesto 5 también fue dependiente del tiempo. En todos los casos la inactivación fue mayor conforme aumentaba el tiempo de incubación, como se muestra en la figura 11. De las curvas de pérdida de actividad con respecto al tiempo a diferentes concentraciones del compuesto 5, se calcularon las constantes de velocidad de pseudo-primer orden (k_{obs}).

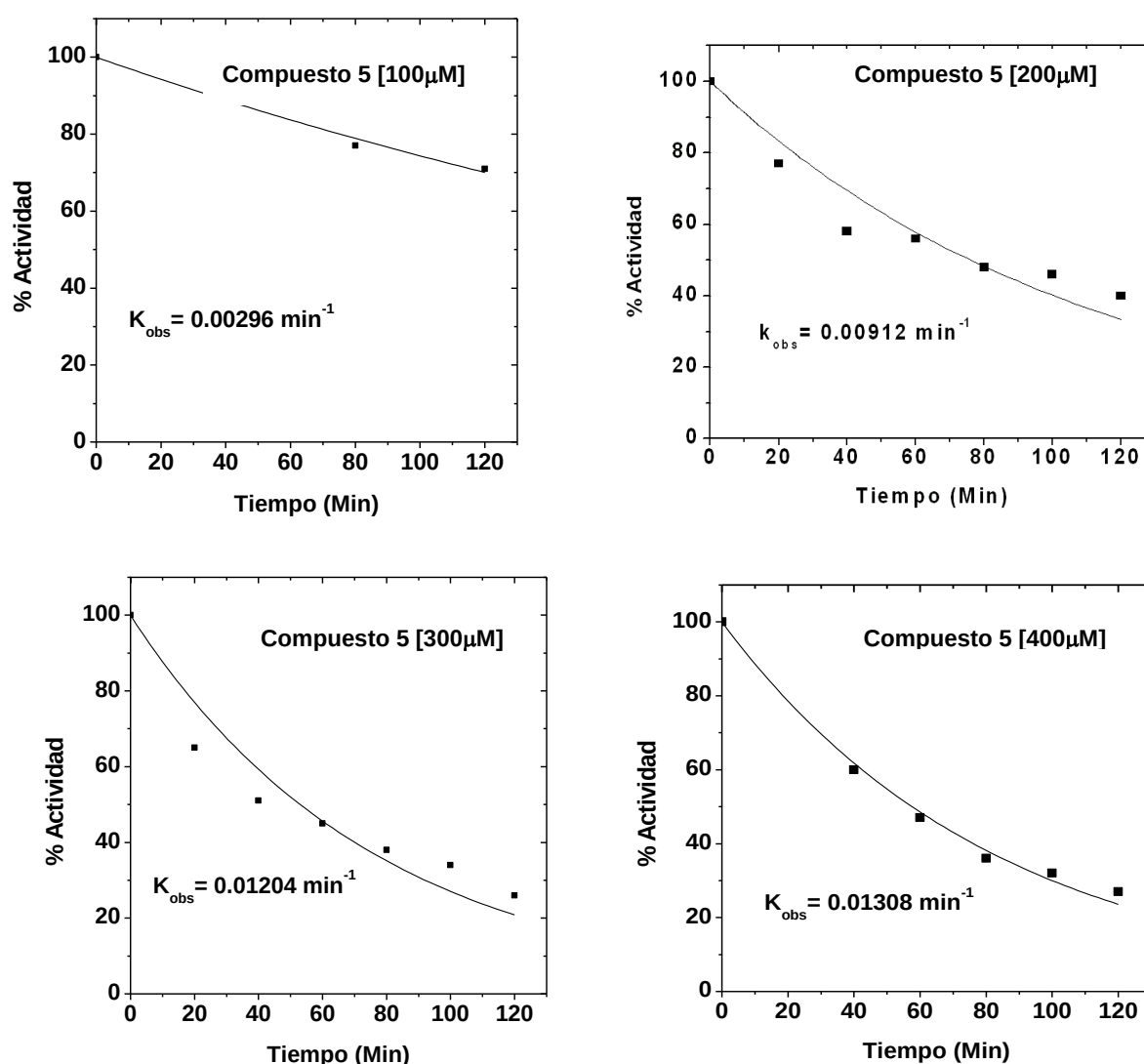


Figura 11. Efecto del tiempo sobre la inactivación del la LmTIM a diferente concentración de compuesto. Las condiciones experimentales se describen en la metodología

De los gráficos de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden, se gráfico las k_{obs} contra las diferentes concentraciones del compuesto 5 para determinar la constante de inactivación aparente de segundo orden (k_{2app}), como se muestra en la figura 12. Sin embargo, como se puede observar en la figura 12, aunque el comportamiento de la curva tiende a una saturación, no fue posible ajustar los datos a la ecuación de Hill para el cálculo de la k_{2app} .

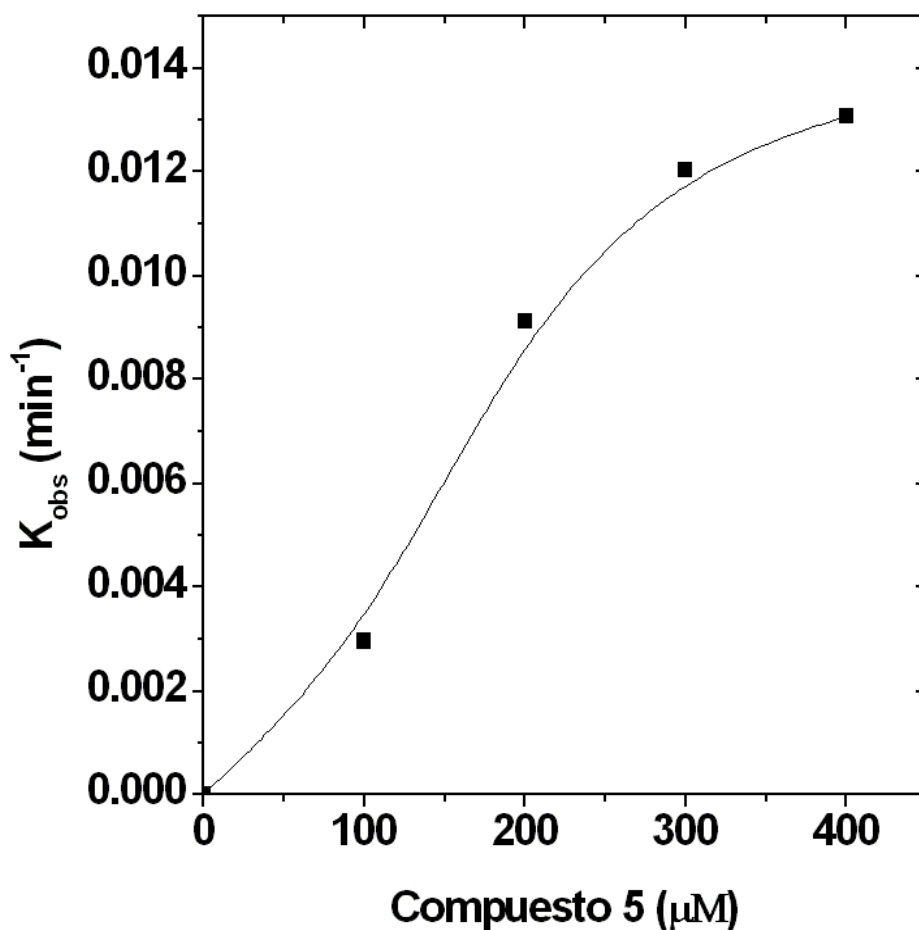


Figura 12. Curva para la obtención de la k_{2app} . Comportamiento de la k_{obs} dependiendo de la concentración del compuesto.

VII.4 Efecto del compuesto 5 a diferentes concentraciones de LmTIM.

En la determinación del mecanismo de acción del compuesto 5, se consideró de importancia explorar si éste compuesto actuaba en la interfase del dímero de LmTIM. La relación entre el estado monomérico y dimérico de enzimas oligoméricas depende de la constante de asociación entre los monómeros, y de la concentración de proteína. Como se puede ver en la figura 13, el efecto de este compuesto fue mayor entre más baja fue la concentración de proteína. Estos datos sugieren que el compuesto 5 actúa sobre la interfase perturbando la asociación de los monómeros.

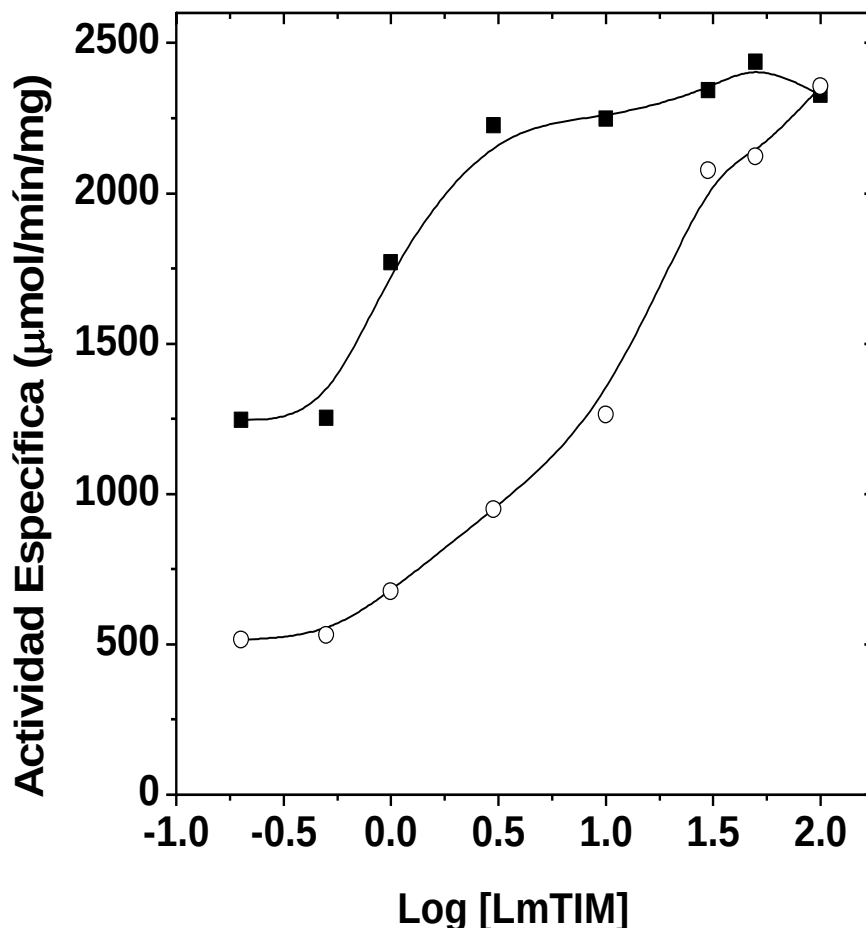


Figura 13. Efecto del compuesto 5 a diferente concentración de LmTIM. Actividad de la enzima sin el compuesto (■) y Actividad de la enzima con el compuesto a 400μM (○).

VII.5 Efecto del compuesto 5 en la TIM de Humano.

Como la TIM es una enzima que se encuentra tanto en el parásito como en el humano; uno de los objetivos de este trabajo fue encontrar moléculas que selectivamente inactivaran la TIM del parásito. Por lo tanto se estudió el efecto del compuesto 5 en la TIM de humano (hTIM) y se encontró que este compuesto también la inactiva como se muestra en la figura 14.

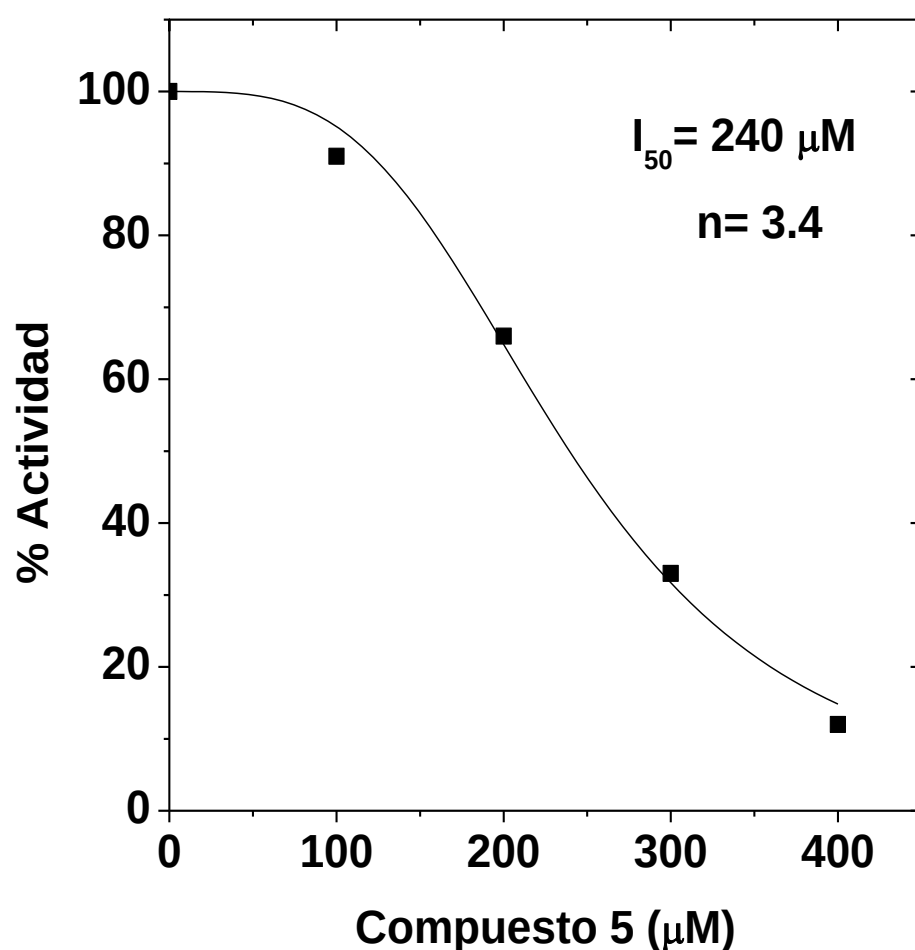


Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones del compuesto 5 en la hTIM. Las condiciones experimentales se describen en la metodología.

El ajuste de esta curva a la ecuación 3, dio como resultado, una I_{50} de $240\mu\text{M}$ y un valor de la constante de Hill de 3.4.

VII.6 Acoplamiento del compuesto 5 en la interfase de la TIM.

Para ganar mayor evidencia sobre cómo actúa este compuesto sobre la enzima, se realizó una simulación por computadora “Docking”, para establecer cómo se estaba llevando a cabo la unión de este compuesto en la interfase del la LmTIM (Fig. 15).

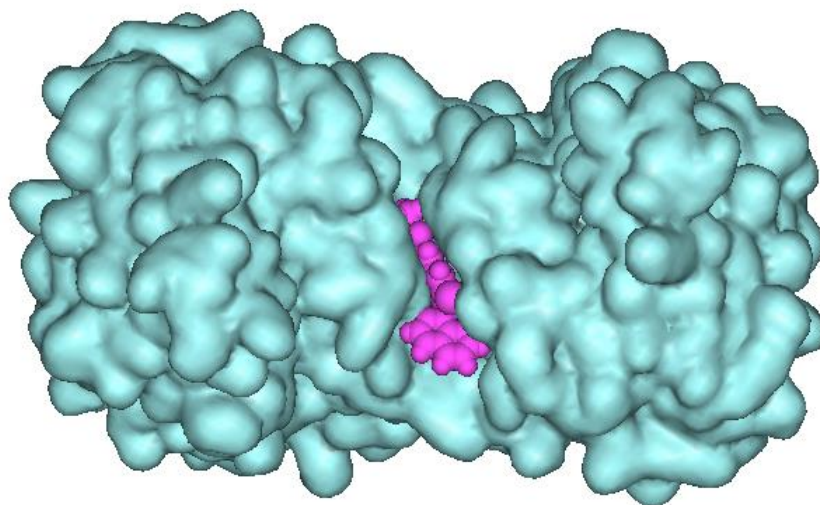


Figura 15. Sitio de Unión del compuesto 5 en la interfase de la LmTIM.

El docking mostró que el compuesto forma puentes de hidrógeno con la Arg 98 del monómero A y con el Glu 77 del monómero B de la LmTIM (Fig. 16).

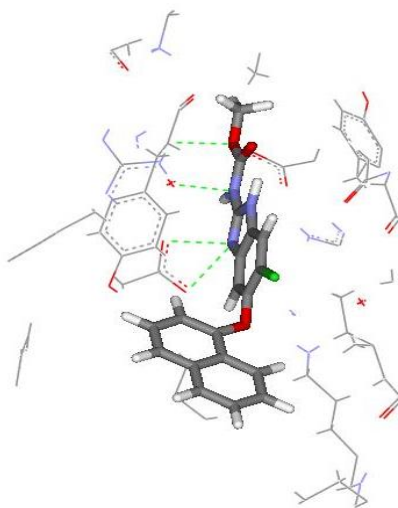


Figura 16. Puentes de hidrógeno entre el compuesto 5 y el dímero de la LmTIM.

También se encontró que aminoácidos de ambos monómeros se encuentran a menos de 5 Å del compuesto (Tabla 4).

Tabla 4. Residuos que se encuentran a menos de 5 Å del compuesto 5 en el dímero de la LmTIM.

Monómero A	Monómero B
Arg 98, Tyr 102, Lys 112, Tyr 101, Glu 104, Ile 68, Glu 77, Asn 66.	Glu 77, Phe 74, Tyr 102, Gly 103, Arg 98, Lys 112, Gln 111, Ile 108, Glu 104, Ile 68, Asn 66.

Debido a que el compuesto también inactivó a la enzima de humano, de igual forma se realizó el docking de este en la interfase de la hTIM. (Fig. 17)

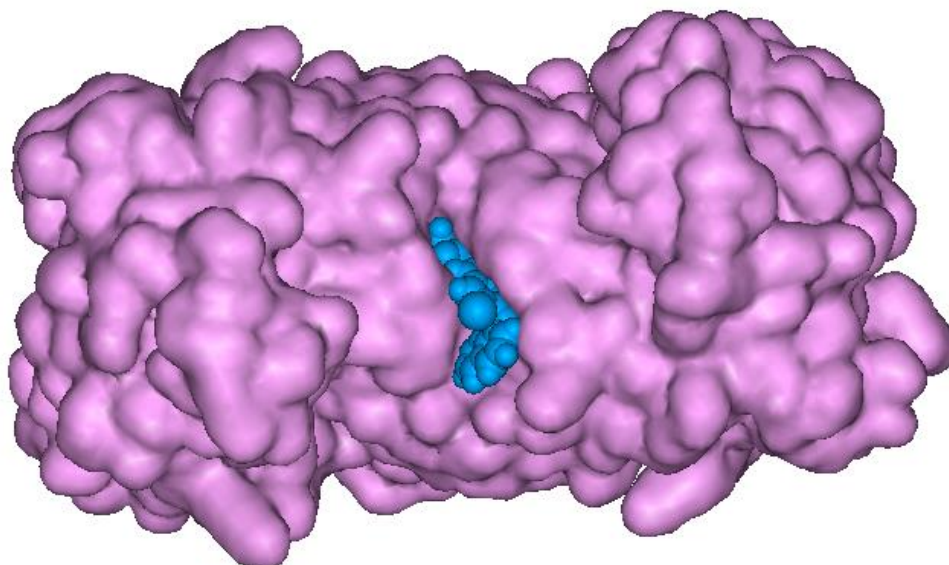


Figura 17. Sitio de Unión del compuesto 5 en la interfase de la hTIM.

Los datos obtenidos mostraron que el compuesto 5 forma puente de hidrógeno con la Phe 102 del monómero A y B (Fig. 18)

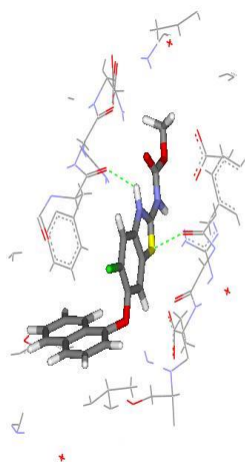


Figura 18. Puentes de hidrógeno entre el compuesto 5 y el dímero de la hTIM.

Así mismo, se encontró que residuos de los dos monómeros se encuentran a menos de 5 Å del compuesto (Tabla 5).

Tabla 5. Residuos que se encuentran a menos de 5 Å del compuesto 5 en el dímero de la hTIM.

Monómero A	Monómero B
Tyr 67, Lys 68, Ser 105, Gly 103, Leu 108, Glu 104, Phe 102, Arg 98, Lys 112, Glu 107.	Lys 112, Leu 108, Glu 104, Gly 103, Asn 65, Arg 98, Phe 102, Val 101, Glu 77, Tyr 67, Cis 56.

VIII. DISCUSIÓN

Los protozoarios causan un alto número de enfermedades, incluyendo la leishmaniasis, causante de significantes tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, los fármacos actualmente disponibles para tratar la leishmaniasis presentan muchas desventajas, incluyendo reacciones adversas, pobre eficacia clínica, administración parenteral y un incremento en los problemas de resistencia a los fármacos. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de nuevos fármacos que actúen en nuevas dianas terapéuticas para hacer frente a estas enfermedades. ⁽⁴⁵⁾ Varios blancos moleculares en los tripanosomátidos se han sugerido, incluyendo su metabolismo de lípidos, transducción de señales e inducción de apoptosis, como también la inhibición específica del acil-coA aciltransferasa en *Leishmania mexicana* ⁽³⁸⁾ y las enzimas de la glucólisis. ⁽⁴⁶⁾

Dentro de las enzimas glucolíticas, en el presente trabajo se estudió a la triosafosfato isomerasa como un posible blanco terapéutico en este organismo. Esta enzima cataliza la interconversión entre GAP Y DHAP y está formada por 2 monómeros idénticos de aproximadamente 250 aminoácidos.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que es posible inactivar con moléculas pequeñas la Triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana*. De los 250 compuestos estudiados, cinco de ellos provocaron cierto grado de inactivación de la LmTIM. Sin embargo, por problemas de solubilidad, los compuestos 3 y 4 no pudieron estudiarse con más detalle. No obstante, con el compuesto 5 si se pudieron realizar una serie de experimentos para determinar el modo de acción del mismo.

Lo primero que se determinó fue el efecto de diferentes concentraciones del compuesto 5 sobre la LmTIM (Fig. 10). La curva de concentración mostró un perfil sigmoidal indicando, que a bajas concentraciones del compuesto se inactivó poco a la enzima, la I_{50} para este compuesto fue de $201\mu\text{M}$. Además, del ajuste de los datos a la ecuación 1 se obtuvo un valor de la constante de Hill de 1.5 lo cual sugiere que se requieren dos molécula del compuesto para inactivar a la LmTIM. El efecto de este compuesto también fue dependiente del tiempo, esto es a mayor tiempo de incubación, fue mayor el porcentaje de inactivación, obteniéndose la constante de pseudo-primer orden para cada concentración (Fig. 11). Con los gráficos de k_{obs} vs concentración del compuesto, se pretendía calcular la $k_{2\text{app}}$; sin embargo, no fue posible debido a que los puntos experimentales no fueron suficientes para poder hacer el ajuste a la ecuación correspondiente. No obstante, como se puede observar en la fig. 12, la curva formada se desvía hacia abajo, es decir, tiende a una saturación. La forma de la misma refleja un proceso en el cual la unión inicial del ligando es seguida por la inactivación de la enzima en donde el paso limitante es la formación del complejo enzima-ligando. ⁽⁴⁷⁾



Continuando con la caracterización del modo de acción de esta molécula, otro aspecto importante por conocer era el sitio en el cual se estaba uniendo. Con este fin, se realizó un experimento a diferente concentración de enzima, pues como se sabe, la proporción entre dímeros y monómeros en las enzimas oligoméricas está determinada por la constante de disociación, la cual depende de la concentración de proteína. Lo que se encontró fue que a menor concentración de enzima, el efecto del compuesto fue mayor (Fig. 13), lo cual sugiere que el compuesto está actuando a nivel de la interfase del dímero. Además, a través de la simulación por computadora de la unión del compuesto 5 en la interfase de la LmTIM, se encontró que el compuesto interactúa con aminoácidos de ambos monómeros y forma puentes de hidrógeno de igual forma con los dos.

Otro punto importante en la caracterización del compuesto fue conocer su efecto en la TIM de humano. Los resultados indicaron que el compuesto 5 también inactiva a esta enzima, teniendo una I_{50} de 240 μ M. Lo anterior, no es bueno desde el punto de vista de selectividad, sin embargo, es importante notar que el valor del número de Hill en este caso fue de 3.4, lo cual sugiere que se requieren al menos 3 moléculas para inactivar a la enzima, y para el parásito fueron 2.

El docking en la TIM de humano mostró que al igual que para la enzima del parásito, el compuesto se une en la interfase e interactúa con aminoácidos de los dos monómeros.

La comparación de la unión del compuesto en ambas enzimas sugiere que la parte del grupo carbamato es la importante para llevar a cabo la inactivación en ambas enzimas. Sin embargo, parece estar involucrada también en la poca selectividad del compuesto respecto de la enzima del parásito.

Para finalizar podemos decir que la aportación del presente trabajo fue encontrar un núcleo base para el diseño de nuevas moléculas que puedan servir como líderes en la obtención de un nuevo fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis.

IX. CONCLUSIONES

- En base a la investigación realizada se observó que es posible inactivar a la triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana* mediante moléculas pequeñas, a concentraciones de 200 μ M.
- El efecto de los cinco compuestos seleccionados y estudiados fue dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de enzima; esto último sugiere que los compuestos interfieren en la asociación de los monómeros.
- El compuesto 5 (metil 5-cloro-6-(naftalen-1-iloxi)-1H-benzo[d]imidazol-2-ilcarbamato), logró inactivar la actividad de la LmTIM en un 50% a una concentración de 201 μ M.
- La inactivación de la triosafosfato isomerasa de *Leishmania mexicana* se puede lograr por medio de la unión de moléculas en la interfase de la misma.
- El compuesto 5 puede servir como modelo para la síntesis de nuevas moléculas con mayor capacidad de inactivación y mayor selectividad, las cuales puedan utilizarse potencialmente como líderes en el diseño de un nuevo fármaco contra la leishmaniasis.

X. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Sánchez SL, Sáenz AE, Pancorbo MJ, Zegarra DR, Garcés VN, Regis RA. Leishmaniasis: *Dermatología Peruana*. Mayo-agosto 2004;14(2).
- 2.- Organización Mundial de la Salud. 2004. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.
- 3.- Soto J, Soto P. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. Centro de Investigaciones Bioclínicas de la fundación FADER, Bogotá, Colombia., *Biomédica* 2006;26(Supl.1):207-17.
- 4.- Espinoza L, Figueroa D. Parasitosis, Programa de Actualización Continua e Infectología. Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, A.C. 1998.
- 5.- Becerril F, Romero C, Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad, Mc Graw-Hill Interamericana, México, DF:2004:65-72.
- 6.- Rodríguez DJ. Las Enfermedades transmitidas por vector en México., Revista de la Facultad de Medicina, UNAM. Mayo-junio 2002;45(3):134-136.
- 7.- Dirección General de Epidemiología. 2008. <http://www.dgepi.salud.gob.mx>
- 8.- Ramos JM, Segovia M. Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis. Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario, Murcia. Primera revisión de la *Rev. Esp. Químio*. 1990.
- 9.- Silva-Vergara ML, Silva L, Maneira FRZ, Da Silva AG, Prata A. Azithromycin in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 2004;46:175-177.
- 10.- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 2004;38:1266-1272.
- 11.- Prasad R, Kumar R, Jaiswal BP, Singh UK. Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian J. Pediatr.* 2004;71:143-144.
- 12.- Sangrula H, Sharma KK, Rijal S, Dwivedi S, Koirala S. Orally effective drugs for kala-azar (visceral leishmaniasis): focus on miltefosine and sitamaquine. *J. Assoc. Physicians India*. 2003;51:686-690.

-
- 13.- Noble ME, Wierenga RK, Lambeir AM, Oppendoes FR, Thunnissen AM, Kalk KH. The adaptability of the active site of trypanosomal triosephosphate isomerase as observed in the crystal structures of three different complexes. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1991;10:50-69.
 - 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 SS, Ray SS, Gokhale RS, Balaram H, Balaram P. & Murthy MRN. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 1997;5:751-761.
 - 16.- Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, et al. Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. *Nature* 1975;255:609-614.
 - 17.- Lolis E, Alber T, Davenport RC, Rose D, Hartman FC, Petsko GA. Structure of yeast triosephosphate isomerase at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* 1990;29:6609-6618.
 - 18.- Wierenga RK, Noble MEM, Vriend G, Nauche S, Hol WGJ. 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.* 1991;220:995-1015.
 - 19.- Noble MEM, Zeelen JP, Wierenga RK. Structure of triosephosphate isomerase from *Escherichia coli* determined at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr.* 1993;D49:403-417.
 - 20.- Mande SC, Mainfroid V, Kalk KH, Goraj K, Martial JA, Hol WGJ. 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.* 1994;3:810-821.

-
- 21.- Delboni LF, Mande SC, Rentier-Delrue F, Mainfroid V, Turley S, Vellieux FMD, 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.* 1995;4:2594-2604.
- 22.- Alvarez M, Zeelen JP, Mainfroid V, Rentier-Delrue F, Martial JA, Wyns L, et al. Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* 1998;273:2199-2206.
- 23.- 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.* 1998;283:193-203.
- 24.- Williams JC, Zeelen JP, Neubauer G, Vriend G, Backmann J, Michels PA, et al. 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.* 1999;12:243-250.
- 25.- Maes D, Zeelen JP, Thanki N, Beaucamp N, Alvarez M, Thi MH, 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.* 1999;37:441-453.
- 26.- Walden H, Bell GB, Russell RJM, Siebers B, Hensel R, Taylor GL. Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 2001;206:745-757.
- 27.- Rodríguez-Romero A, Hernandez-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Kornhauser A, Fernández-Velasco DA. Structure and inactivation of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. *J. Mol. Biol.* 2002;322:669-675.
- 28.- Symersky J, Li S, Carson M, Luo M. Structural genomics of *Caenorhabditis elegans*: triosephosphate isomerase. *Proteins* 2003;25:484-486.

-
- 29.- Walden H, Taylor GL, 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.* 2004;342:861-875.
- 30.- Gayathri P, Banerjee M, Vijayalakshmi A, Azeez S, Balaram H, Balaram P, et al, Structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2007;63:206-220.
- 31.- Knowles JR. Enzyme catalysis: not different, just better. *Nature* 1991;350:121-124.
- 32.- Kursula I, Wierenga RK. Crystal structure of triosephosphate isomerase complexed with 2-phosphoglycolate at 0.83-A resolution. *J. Biol. Chem.* 2003;278:9544-9551.
- 33.- Harris T K, Cole RN, Comer FI, Mildvan AS. Proton transfer in the mechanism of triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 1998;37:16828-16838.
- 34.- Alagona G, Ghio C, Kollman PA, The intramolecular mechanism for the second proton transfer in triosephosphate isomerase (TIM):AQM/FE approach. *J. Comput. Chem.* 2003;24:46-56.
- 35.- Sun J, Sampson NS. Understanding protein lids: kinetic analysis of active hinge mutants in triosephosphate isomerase. *Biochemistry* 1999;38:11474-11481.
- 36.- Richard JP. Acid-base catalysis of the elimination and isomerization reactions of triose phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* 1984;106:4926-4936.
- 37.- Wierenga RK, Noble ME, Davenport RC. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.* 1992; 224, 1115-1126.
- 38.- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology*, November 2003;11(19):502-508.
- 39.- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, March 2006:399-410.

-
- 40.- Salem MM, Werbovetz AK. Natural Products from Plants as Drug Candidates and Lead Compounds Against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* 2006, 13:2571-2598.
- 41.- Machado-Pinto J, Pinto J, Da Costa CA, Odiar G, Marques MJ, Farrokh M, et al. Immunodermotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. *Inter. J. Derma.* 2002;41:73-78.
- 42.- Lipinski F, Lombardo B, Dominy PJ, Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Del. Rev.* 2001, 46:3-26.
- 43.- Téllez-Valencia A, Avila-Ríos S, Perez-Montfort R, Rodriguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, Lopez-Calahorra F, et al. Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;295:958-63.
- 44.- Tovar-Méndez A, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA. Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 2000;223:149-160.
- 45.- Khabnadideh S, Pez D, Musso A, Brun R, Ruiz PLM, González-Pacanowska D, et al. Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. *Bioorg. Med. Chem.* 2005;13:2637-2649.
- 46.- Opperdoes FR, Michels PA. Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drugs targets. *Int. J. Parasitol.* 2001;31:482-490.
- 47.- Pettigrew DW. Inactivation of *Escherichia coli* glycerol kinase by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and N-ethylmaleimide: evidence for nucleotide regulatory binding sites. *Biochemistry* 1986;25:4711-4718.